

Luminesenssia tuottavan geenikasetin käyttö toksisten geenien seulonnassa

Milla-Maaria Trivedi
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maatalous- ja
metsätieteellinen tiedekunta
Mikrobiologian osasto
Toukokuu 2020

Tiedekunta/Osasto □ Fakultet/Sektion □ Faculty Maatalous- ja metsätieteellinen tiedekunta		Laitos □ Institution □ Department Mikrobiologian osasto	
Tekijä □ Författare □ Author Milla-Maaria Trivedi			
Työn nimi □ Arbetets titel □ Title Luminesenssia tuottavan geenikasetin käyttö toksisten geenien seulonnassa			
Oppiaine □ Läroämne □ Subject Mikrobiologia			
Työn laji □ Arbetets art □ Level Maisterintutkielma		Aika □ Datum □ Month and year Toukokuu 2020	Sivumäärä □ Sidoantal □ Number of pages 82
<p>Tiivistelmä □ Referat □ Abstract</p> <p>Tämä maisterintutkielma on osa tutkimusohjelmaa, jossa on tarkoitus tunnistaa uusia antibioottien vaikutuskohteita bakteereissa. Tavoitteena oli pystyttää Haartman-instituutissa molekyylibiologinen menetelmä, jolla voitaisiin selvittää faagigeenien tuottamien proteiinien toksisuutta. Menetelmän kehityksessä korostui tarve pystyä analysoimaan tehokkaasti mahdollisimman monta tuntematonta faagigeeniä ja niiden toimintaa. Työssä kehitetty menetelmä perustui bioluminesenssin käyttöön toksisuuden havaitsemiseksi. Ensimmäisessä vaiheessa valmistettiin plasmidi, joka sisälsi <i>luxAB</i>-geenit. Työn toisessa vaiheessa muodostettiin itsemurhavektori, joka sisälsi <i>luxCDE</i>-geenit. Itsemurhavektorin sisältämät <i>luxCDE</i>-geenit integroitiin bakteerin genomiseen deoksiribonukleiinihappoon (gDNA), jonka jälkeen <i>luxAB</i>-geenit sisältävä plasmidi voitiin elektroporoida kyseiseen bakteeriin. Yhdessä nämä muodostivat geeniyhdistelmän <i>luxCDABE</i>, joka pystyi tuottamaan valoa bioluminesenssin avulla.</p> <p>Jos <i>luxAB</i>-plasmidiin kloonattavan geenin tuote on toksinen, eivät plasmidin saaneet transformantit elektroporaation jälkeen säily hengissä, minkä seurauksena transformantit eivät tuota valoa, kun taas, jos geenin tuote ei ole toksinen, tapahtuu valon tuottoa. Toisin sanoen, luminesenssin puuttuessa menetelmä toimisi halutulla tavalla eli indikoisi geenien tuottamien proteiinien toksisuutta. Menetelmän toimivuutta testattiin käyttämällä tunnettuja bakteerikantoja, jotka sisälsivät <i>luxCDE</i>-geenikasetin. Tarkoituksena oli varmistaa <i>luxAB</i>-geenien toimivuus komplementoida minkä tahansa bakteerin <i>luxCDE</i>-geenit. Tarkoitus oli saada aikaan menetelmä, jolla voidaan nopeasti ja tehokkaasti selvittää tuntemattomien faagigeenien toimintaa. Bioluminesenssin tuottama valo erottuu selkeästi ja menetelmä on helposti toistettavissa.</p> <p>Työssä kehitettyä <i>luxAB</i>-geenit sisältävää plasmidia voidaan jatkotutkimuksissa testata ensin tunnetuilla kontrolligeeneillä ja lopuksi käyttää toksisia proteiineja tuottavien faagigeenien tunnistamisessa.</p>			
Avainsanat □ Nyckelord □ Keywords Reportterivektori, itsemurhavektori, bioluminesenssi, faagi, bakteriofagi, <i>luxCDABE</i> .			
Säilytyspaikka □ Förvaringsställe □ Where deposited Helsingin yliopiston kirjasto - Helda / E-thesis (opinnäytteet)			
Muita tietoja □ Övriga uppgifter □ Further information Työn ohjaajat: professori Mikael Skurnik ja dosentti Maria Pajunen			

Tiedekunta/Osasto □ Fakultet/Sektion □ Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos □ Institution □ Department Department of Microbiology	
Tekijä □ Författare □ Author Milla-Maaria Trivedi			
Työn nimi □ Arbetets titel □ Title Construction of luminescent reporters for screening of toxic gene products			
Oppiaine □ Läroämne □ Subject Mikrobiology			
Työn laji □ Arbetets art □ Level Pro gradu		Aika □ Datum □ Month and year May 2020	Sivumäärä □ Sidoantal □ Number of pages 82
<p>Tiivistelmä □ Referat □ Abstract</p> <p>This Master's thesis was made as part of a research project that aims to indentify novel targets for antibiotics against bacteria. The aim was to set up a molecular biology method at the Haartman-Institute to determine of the toxicity of proteins encoded by bacteriophage genes. The development of the method underline the need to analyze unknown phage genes and their function. The method development was based on the use of bioluminescence to detect the toxicity. The first step was to prepare a plasmid containing <i>luxAB</i> genes. In the second phase the suicide vector containing the <i>luxCDE</i> genes was constructed.</p> <p>The suicide vector with the <i>luxCDE</i> genes was integrated into the bacterial genomic deoxyribonucleic acid (gDNA). After that plasmid with the <i>luxAB</i> genes was electroporated into the bacterium. Together these formed the <i>luxCDABE</i> gene combination which was able to produce light by bioluminescence.</p> <p>By ligating toxic genes to the <i>luxAB</i> plasmid and in the absence of luminescence the method works as desired i.e. indicates the toxicity of the proteins produced by the phage genes. From the light produced by the bioluminescence it can be concluded that the proteins produced by the genes are non-toxic.</p> <p>The method was standardized as using known bacterial control strains with the <i>luxCDE</i> gene cassette. The purpose of that was to ensure the functionality of <i>luxAB</i> genes in the plasmid when it was combined with <i>luxCDE</i> genes of any bacterium. The aim was to provide a method for rapidly and efficiently investigating the function of unknown phage genes. The light produced by the bioluminescence is clearly distinguished and the method is easily reproducible.</p> <p>In a further study the plasmid containing of <i>luxAB</i> genes can be tested with known control genes and finally used in diagnostics of phage genes producing toxic proteins.</p>			
Avainsanat □ Nyckelord □ Keywords Reporter vector, suicide vector, bioluminescence, phage, bacteriophage, <i>luxCDABE</i> .			
Säilytyspaikka □ Förvaringsställe □ Where deposited HELDA - Digital Repository of the University of Helsinki			
Muita tietoja □ Övriga uppgifter □ Further information Pro gradu supervisors: professor Mikael Skurnik and Docent Maria Pajunen			

SISÄLLYSLUETTELO

SISÄLLYSLUETTELO	4
LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	8
2 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	9
3 <i>YERSINIA</i>	10
4 ANTIBIOOTTIRESISTENSSI JA BAKTERIOFAGIT	12
4.1 Bakteriofagien taksonomia ja morfologia	12
4.2 Bakteriofagin endolysiinit ja elinkierto	15
4.3 Bakteriofagireseptorit	16
5 PLASMIDIT JA VEKTORIT	17
5.1 Reportterivektorit	18
5.2 Itsemurhavektorit	18
6 REPORTTERIGEENIT JA MENETELMÄT	18
6.1 Bioluminesenssi	19
6.2 Bioluminesenssin biokemia ja luminometria	20
6.3 Luminesenssigeenit bakteerissa	20
7 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	21
8 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	24
8.1 Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat ja niiden kasvatus	24
8.2 Työssä käytetyt plasmidit, gDNA ja niiden eristys	27
8.3 Koedigestiot ja vektoreiden sekä inserttien digestointi	27
8.4 Agaroosigeelielektroforeesi	28
8.5 DNA-tuotteiden puhdistus	29
8.6 Työssä käytetyt alukkeet ja PCR	29
8.7 Plasmidien sekvensointi	32
8.8 Elektroporaatio ja transformaatio	32
8.9 Transformanttien seulonta	33
8.10 Konjugaatio	34
8.11 Ligaatit	34
8.12 pMMT1-plasmidin valmistus	36

8.13 Itsemurhaplasmidin valmistus	38
8.14 Valontuoton testaus	43
8.15 Valontuoton standardisointi	43
9 TULOKSET	44
9.1 pMMT1-plasmidi	44
9.2 Itsemurhavektori, genomisen palan siirto pUC19-plasmidiin	49
9.3 Itsemurhavektori, <i>luxCDE</i> -palan insertointi genomisen palan keskelle	53
9.4 Itsemurhavektorin pSW23T valmistus	57
9.5 Insertin siirto pSW23T-itsemurhavektoriin	59
9.6 Konjugaatio	60
9.7 Valontuoton testaus pMMT1-plasmidilla ja merodiploideilla	62
9.8 Valontuoton standardisointi kontrollikannoilla	63
9.9 Plasmidien sekvensointi ja kuvittaminen	64
10 TULOSTEN TARKASTELU	68
10.1 pMMT1-plasmidin kloonauk	68
10.2 Itsemurhaplasmidin kloonauk	69
10.3 Valontuoton testaus ja standardisointi	71
11 JOHTOPÄÄTÖKSET	72
12 KIITOKSET	74
LÄHTEET	75
LIITE 1: TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT AINESEOKSET	83
LIITE 2: TYÖSSÄ KÄYTETYT LAITTEET JA NIIDEN KÄYTTÖTARKOITUS	85
LIITE 3: pMMT1 -PLASMIDIN SEKVENSSI	86
LIITE 4: B4 -PLASMIDIN SEKVENSSI	87
LIITE 5: B4_5 -PLASMIDIN SEKVENSSI	88
LIITE 6: B4_5_9 -PLASMIDIN SEKVENSSI	90
LIITE 7: VALON TUOTON TESTAUS LUMINESENSSI JA ABSORBANSSI	92
LIITE 8: VALON TUOTON STAND. LUMINESENSSI JA ABSORBANSSI	93

LYHENTEET

Amp	Ampisilliini (engl. Ampicillin)
ATP	Adenosiinitrifosfaatti (engl. Adenosine triphosphate)
bp	Emäspari (engl. base pair)
Clm	Kloramfenikoli (engl. Chloramfenicol)
CPE	Karpapenemaaseja tuottavat enterobakteerit (engl. Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>)
ESBL	Laajakirjoista beetalaktamaasientsyymiä tuottavat bakteerit (engl. Extended-Spectrum Beta-Lactamase)
DAP	Diaminopimeliinihappo (engl. Diaminopimelic acid)
DNA	Deoksiribonukleiinihappo (engl. Deoxyribonucleic acid)
dsDNA	Kaksijuosteinen DNA (engl. double stranded DNA)
gDNA	Genominen DNA (engl. genomic DNA)
ssDNA	Yksijuosteinen DNA (engl. single stranded DNA)
kb	Kiloemäspari (engl. kilo base pair)
Km	Kanamysiini (engl. Kanamycin)
LB	Lysogeny broth -kasvatusalusta
LA	Lysogeny broth -kasvatusalusta + agar
MRSA	Metisilliinille resistentti <i>Staphylococcus aureus</i> (engl. Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
Mbp	Megaemäspari (engl. Megabasepair)
OD	Optinen tiheys (engl. optical density)
PCR	Polymeraasiketjureaktio (engl. Polymerase chain reaction)
PHG	Faagien tuottamat endolysiinit (engl. phage-encoded peptidoglycan hydrolases)
R	Resistentti (engl. resistant)
rpm	Kierrosta minuutissa (engl. revolutions per minute)
RNA	Ribonukleiinihappo
ssRNA	Yksijuosteinen ribonukleiinihappo (engl. single stranded Ribonucleic acid)
RLU	Suhteellinen valoyksikkö (engl. relative light unit)
RT	Huoneenlämpö (engl. room temperature)
Spe	Spektinomysiini (engl. Spectinomycin)

Strept	Streptomysiini (engl. Streptomycin)
VAPGH	Virusperäinen peptidoglykaani hydrolaasi (engl. virion-associated peptidoglycan hydrolases)
VRE	Vankomysiinille resistentti enterokokki (engl. Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus</i>)
YeO:3	<i>Yersinia enterocolitica</i> serotyyppi O:3

1 JOHDANTO

Antibioottiresistenssin kasvaessa uusien hoitomuotojen kehittäminen mikrobeja vastaan on välttämätöntä. Nykyaikana patogeenisten bakteerien antibioottiresistenssi kasvaa nopeampaa kuin uusia lääkkeitä tai vaihtoehtohoitoja pystytään kehittämään. Resistenttien bakteerien aiheuttamat infektiot ovat maailmanlaajuinen ongelma (WHO, 2018).

Bakteriofagit ovat organismeja, joilla on luontainen kyky rajoittaa bakteerien toimintaa. Ne ovat viruksia, jotka kykenevät hajottamaan bakteereja myös niiden luonnollisessa ympäristössä. Erilaisten faagien eri geenien tuottamat proteiinit ovat spesifisiä tietyille mikrobeille ja monen geenin toiminta on edelleen tuntematon (Skurnik ym, 2007).

Bakteerien aiheuttamiin sairauksiin pyritään kehittämään jatkuvasti uusia hoitomuotoja. Faagiterapia on tärkeä osa-alue, jonka avulla tutkitaan vaihtoehtoista hoitoa antibioottiresistenssin omaavia bakteereja vastaan, kokonaisten toimivien faagien avulla. Faagien ominaisuuksia voidaan hyödyntää myös niin, että faagien geeneistä pyritään löytämään ja karakterisoimaan luonnollisesti bakteereille toksisia spesifisiä geenejä, jonka tuottamat proteiinit vaikuttavat bakteerin kykyyn infektoida. Näiden faagien ja niiden geenien tuottamien proteiinien käyttäminen lääkkeenä ja kaupallisessa käytössä on jo aloitettu. Tutkimus kulkee vauhdilla eteenpäin (Kiljunen & Skurnik 2018, Mohanraj ym. 2019, Spruit ym. 2019).

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli osaltaan edistää tarkempaa tutkimusta, jolla pyritään löytämään faagien tuottamia toksisia proteiineja bakteerien aiheuttamien infektioiden ja tulehdusten hoitoon. Tavoitteena oli pystyttää molekyylibiologinen menetelmä, jonka avulla voitaisiin identifioida bakteriofagien käyttämiä geenejä ja niiden tuottamia proteiineja, jotka ovat merkitseviä taistelussa bakteereja vastaan.

Bakteriofageilla voi olla ratkaiseva vaikutus erilaisten resistenttien infektioiden hoidossa. Koska yleisimpiä antibioottiresistenssi-infektioita aiheuttavia bakteereja ovat laajakirjoista beetalaktamaasientsyymiä tuottavat bakteerit (ESBL) kuten *Escherichia coli* (*E. coli*) ja *Klebsiella pneumoniae*, Metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA), Karpapenemaaseja tuottavat enterobakteerit (CPE) kuten *Enterobacter spp.* ja *Klebsiella pneumoniae*, Vankomysiinille resistentit enterokokit (VRE) kuten *Enterococcus faecium* ja *Enterococcus faecalis*, tullaan tutkimuksissa valitsemaan näille bakteereille spesifiset bakteriofagit jatkotutkimuksiin (Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2019).

2 *ESCHERICHIA COLI*

E. coli -bakteerin havaitsi ensimmäisen kerran tutkimuksissaan saksalaisitävaltalainen lääkäri nimeltä Theodor Escherich vuonna 1885. Hän alkoi tutkia ulosteen normaaliflooraa, josta hän havaitsi 19 erilaista bakteeria. Yhtä niistä hän kutsui nimellä *Bacterium coli commune*, joka myöhemmin vuonna 1919 nimettiin hänen mukaansa (Shulman ym. 2007).

E. coli -bakteereja on montaa eri alatyyppejä ja ne kuuluvat *Enterobacteriaceae*-heimoon. Bakteereja löytyy maaperästä ja luonnonvesistä, ja niitä elää eläinten ja ihmisten suolistossa, jossa ne muodostavat aerobibakteerien enemmistön. Bakteerit ovat kooltaan noin kahden mikrometrin pituisia ja puoli mikrometriä halkaisijaltaan. Kaikilla fakultatiivisesti anaeroobeilla *E. coli* -bakteereilla on samanlainen aineenvaihdunta, mutta niiden virulenssiominaisuudet ovat erilaiset. Ne saattavat sisältää plasmideja ja tuottavat jopa tuhatta erilaista entsyymiä. Patogeeniset *E. coli* -bakteerit tarttuvat usein joko elintarvikkeiden tai juomavesien välityksellä. Opportunistiset bakteerit aiheuttavat myös infektioita ja ne ovat usein peräisin ihmisen normaalifloorasta. Kolibakteerit aiheuttavat tyypillisesti virtsatie- ja suolistotulehduksia. *E. coli* -bakteeria voidaan löytää myös sääri- tai makuuhaavoista ja harvoissa tapauksissa se voi myös aiheuttaa vakavan infektion seurauksena sepsiksen eli verenmyrkytyksen. Bakteerin hajotessa ulkomembraanista vapautuu lipopolysakkaridia, jota kutsutaan myös endotoksiiniksi, joka voi aiheuttaa endotoksiinishokin. *E. coli* -bakteerit ovat usein luonnostaan resistenttejä monille antibiooteille, mutta bakteeri-infektioita voidaan hoitaa beetalaktaamiantibiooteilla eli 2. ja 3. sukupolven kefalosporiineilla. ESBL-kannat tuottavat entsyymejä, joilla ne pystyvät pilkkomaan antibiootteja. Näille kannoille ei voida käyttää tavallisimpia antibioottihoitomuotoja (Hedman ym. 2010).

Kolibakteerit ovat gramnegatiivisia sauvoja, joiden ulkomembraanista noin 70% koostuu lipopolysakkaridista. Bakteerisolua suojaavat sisempi solukalvo ja ulompi soluseinä. Bakteerit voidaan lajitella kolmen eri serotyypin kategoriaan niiden antigeenien O, K ja H avulla. O-antigeenin serotyyppi viittaa siihen, että bakteerin ulkomembraanilla on LPS O-polysakkaridi. K-antigeenin serotyyppi määrittää sen, että bakteeri pystyy muodostamaan polysakkaridikapselin, joka löytyy usein infektoivilta bakteereilta. H-antigeenin omaavilla bakteereilla on flagella, jolla se pääsee liikkumaan. Kolibakteereilla on myös fimbriot eli pilukset tai adhesiineja, joilla ne voivat tarttua tai kiinnittyä esimerkiksi suoliston seinämään. Tunnetuimpia suolistotulehduksia aiheuttavia *E. coli* -kantoja voidaan luokitella niiden virulenssitekijöiden mukaan. Näitä ovat: ETEC eli enterotoksigeeninen bakteeri, joka

tuottaa LT- (heat labile toxin) ja ST- (heat stable toxin) toksiinia. EHEC eli enterohemorraaginen kanta, joka tuottaa Shiga-toksiinia. EPEC eli enteropatogeeninen bakteeri, joka tarttuu suoliston seinämään. EIEC eli enteroinvasiivinen patogeeni, joka tunkeutuu suolistoepiteelin läpi. Lisäksi EAEC eli enteroaggregatiivinen kanta, joka on myös tunnettu sen kyvystä tarttua kudoksiin. DAEC eli diffuusisti adheroituvan kannan patogeenisyys on vielä tutkinnan alla, mutta viitteitä lasten ripulitauteihin on jo löytynyt. (Hedman ym. 2010).

E. coli -bakteereja käytetään kaupallisesti molekyylibiologian erilaisissa laboratoriomenetelmissä, koska niiden kasvu on nopeaa ja ne ovat valmiiksi karakterisoituja (Blattner ym. 1997). Kolibakteerit kasvavat parhaiten +37 °C. Niiden on nähty lisääntyvän myös korkeammissa lämpötiloissa, jopa +49 °C, ja selviytyvän +53 °C jakautumatta (Fotadar ym. 2005). Bakteereja voidaan kasvattaa yleisimmillä kasvualustoilla (esimerkiksi LB: Lysogeny broth -kasvatusalusta, LA: Lysogeny broth -kasvatusalusta + agar) ja ne kasvavat sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa. Bakteeri tuottaa adenosiniitrifosfaattia (ATP) hapen läsnä ollessa, mutta hapettomissa olosuhteissa se voi vaihtaa metabolian käyttönsä fermentaatioon tai anaerobiseen respiraatioon (Dharmadi ym. 2006, Shulman ym. 2007). Geenitekniikan käyttökohteita ovat niiden tuottamat plasmidit ja gDNA, sekä niitä voidaan käyttää myös isäntäbakteerisoluna. *E. coli* on yleisesti käytetty luminesenssin ekspressiossa (Korpela ym. 1998, Meighen 1991).

3 *YERSINIA*

Sveitsiläinen bakteriologi Aleksandre Yersin löysi *Yersinia pestis* -bakteerin vuonna 1894 tutkiessaan paiseruttoa. Aluksi bakteeria kutsuttiin *Kitasato-Yersin bacillus* -nimellä, sillä löydöksen aikajana ja bakteerin ominaisuudet olivat kiistanalaisia. Kuitenkin vuonna 1944 bakteeri nimettiin Yersinin mukaan, sillä hän pystyi yhdistämään löydöksen paiseruttoon (Butler 2014, Zietz & Dunkelberg 2004).

Yersinia-bakteerit kuuluvat *Enterobacteriaceae*-heimoon ja niitä on 17 eri lajia. Bakteerit luokitellaan gramnegatiivisiin fakultatiivisiin anaerobisiin sauvoihin. Lajit voidaan jakaa patogeenisiin taudinaiheuttajiin ja ei-patogeenisiin kantoihin. Eri lajeja ovat *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. similis* ja *Y. massi-*

liensis. Tunnettuja ihmiselle patogeenisia lajeja ovat *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* ja *Y. pseudotuberculosis*. Nämä tunnetut kannat sisältävät 72 kiloemäsparin (kb) kokoisen virulenssiplasmidin, *Y. pestis* -kanta sisältää lisäksi kaksi muuta virulenssiplasmidia (Hedman ym. 2010). Bakteereita tavataan maaperässä ja vesistöissä, joten ne elävät usein tuotanto- ja lemmikieläinten suolistoissa. Sika ja muut eläimet saattavat kantaa oireettomana *Yersinia*-bakteeria. Muita tartuntaeläimiä voivat olla jyrsijät ja linnut. Tauti tarttuu ihmiseen yleensä ruoan välityksellä, tartuntalähteitä ovat esimerkiksi sianliha ja kasvikset. Myös kirpun tai eläimen purema voi aiheuttaa bakteeri-infektion (*Y. pestis*) (Lumio 2018, Räisänen & Ala-vaikko 1989). *Y. enterocolitica* aiheuttaa suolistotulehduksia, imurauhastulehduksia ja artriittia. *Y. pestis* voi aiheuttaa paise- ja keuhkoruttoa ja se on ollut myös maailman laajuisen pandemian aiheuttajana mustassa surmassa. *Y. pseudotuberculosis* voi aiheuttaa kuduskuolioita, reaktiivisia niveltulehduksia, kyhmyruusua ja vakavissa infektioiden myös sepsistä (Hedman ym. 2010). *Y. enterocolitica* voidaan luokitella kahteen alalajiin ssp. *palearctica*, joita esiintyy viisi erilaista biotyyppiä euroopassa (1A, 2, 3, 4, 5) ja ssp. *enterocolitica* (1B), joka on amerikkalainen alalaji. Erilaisia serotyyppejä *Y. enterocolitica* -kannassa on yli 70, mutta tunnetuimpia niistä ovat ihmispatogeenit O: 3, O: 8, O: 9, O: 5 ja 27 (Wauters ym. 1987). *Yersinia*-bakteerin aiheuttamia infektiota voidaan hoitaa antibiooteilla. *Y. enterocolitica* on luonnostaan ampicilliiniresistentti, kun taas *Y. pseudotuberculosis* on ampicilliinille herkkä. (Hedman ym. 2010).

Yersinia-bakteerit ovat fakultatiivisesti anaerobisia psykotrofeja, joten ne pystyvät kasvaamaan jopa 0 °C - +44 °C:een ja kestävät hyvin sekä pakastamista että sulatusta (Keet 1974). Bakteerin optimi kasvulämpötila on +28 °C, mutta se kasvaa helposti myös muissa lämpötiloissa. Niiden pH:n ja suolapitoisuuden sietokyky on erittäin laaja. *Y. enterocolitica* pysyy sietämään pH vaihtelua jopa pH 4 -10:een, mutta kasvaminen tapahtuu parhaiten pH 6 -9 välillä. Ympäristön natriumkloridipitoisuus voi nousta jopa 5,0 % asti. Tämä ominaisuus tekee bakteerista erittäin sopeutuvaisen ja se on myös metabolisesti erittäin aktiivinen myös laboratorio-olosuhteissa (Bottone 2015, Hanna ym. 1977, Stern ym. 1980). Luminoivan geenikasetin konstruktiossa *Y. enterocolitica* on osoittautunut erittäin stabiiliksi, sillä *luxCDABE*-geeni vaatii metabolisesti aktiivisen isäntäbakteerin. Bakteeria on käytetty menestyksekkäästi luminoivan geenikasetin konstruktiossa monessa eri menetelmässä (Bozcal ym. 2017, Trček ym. 2010). *Yersinia*-bakteerien geenejä voidaan myös käyttää molekyylibiologian laboratoriomenetelmissä, esimerkiksi *Y. enterocolitica* (O:3) *ompF*-promootorifragmentti on yleisesti käytetty molekyylibiologian menetelmissä, sillä sen ekspressio on voimakasta (Carver ym. 2012, Lee ym 2009).

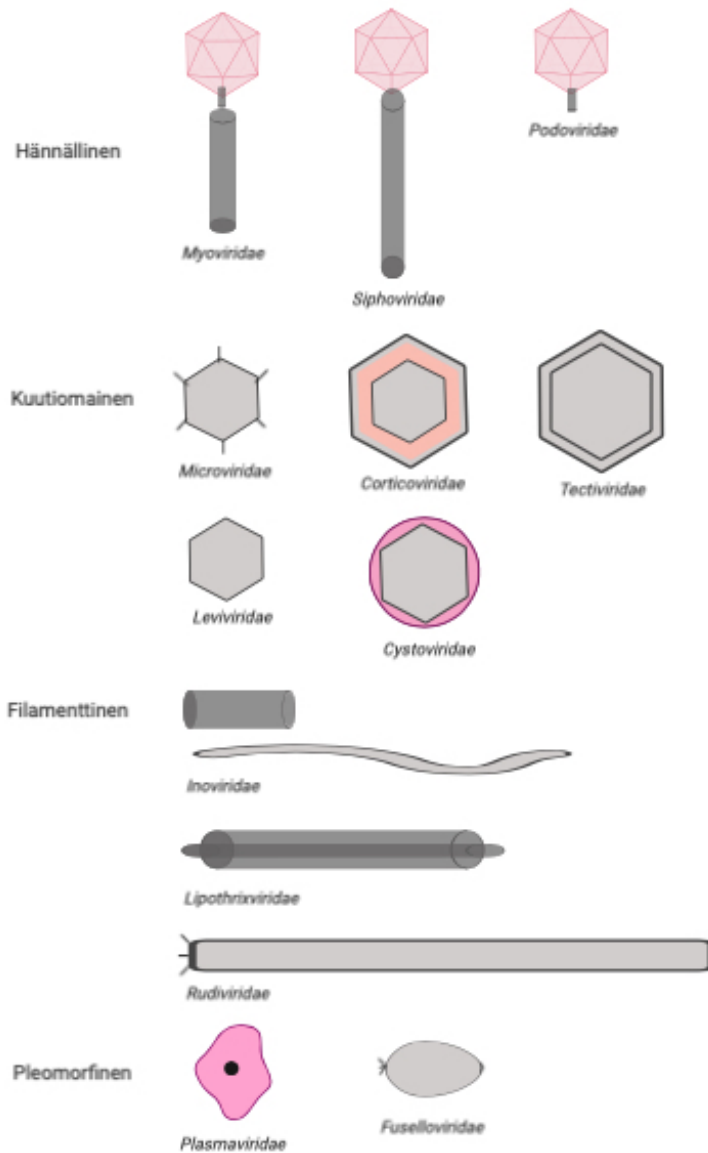
4 ANTIBIOOTTIRESISTENSSI JA BAKTERIOFAGIT

Penisilliini löydettiin noin sata vuotta sitten sattuman kautta 1920-luvulla Alexander Flemingin toimesta ja kliiniseen käyttöön se tuli 1940-luvulla. Tämän jälkeen antibioottien kehitys nousi uudelle tasolle ja niitä käytettiin menestyksekkäästi vuosikymmeniä (Gaynes, 2017). Kuitenkin jo 1980-luvulla gramnegatiiviset bakteerit alkoivat tuottaa ongelmia, jonka jälkeen myös antibiooteille herkät grampositiiviset bakteerit alkoivat saamaan resistenttejä ominaisuuksia (Vaara & Saxén, 1999). Nykyaikana antibioottiresistenssin kasvassa uusia vaihtoehtoisia antimikrobilääkkeitä yritetään kehittää nopeasti ja tehokkaasti. Antibioottiresistenssi aiheuttaa 700 000 kuolemaa maailmassa joka vuosi. Vuoteen 2050 mennessä arvoidaan kuolemia olevan jo noin 10 miljoonaa per vuosi (Tagliabue & Rappuoli, 2018).

Bakteriofagit havaittiin mahdollisesti ensimmäisen kerran vuonna 1896 Italiassa bakteriologi Ernest Hankinin toimesta. Tällöin niitä ei kuitenkaan yritetty tunnistaa, vaikka ne kykenivät tappamaan Ganges- ja Jumna-joen *Vibrio cholerae* -bakteereja. Vuonna 1915 Frederick Twort havaitsi myös mahdolliset faagit ja oletti niiden olevan viruksia. Pari vuotta myöhemmin ranskalaiskanadalainen lääkäri Felix d'Herrelle alkoi tutkimaan näitä viruksia tarkemmin ja huomasi niiden infektoivan kyvyn tappaa bakteereja. Hän nimesi tuntemattoman aineen bakteriofagiksi (Abedon ym. 2011). Myöhemmin näitä niin kutsuttuja antiviruksia käytettiin bakteereja vastaan, josta syntyi termi faagiterapia (Eaton & Bayne-Jones, 1934).

4.1 Bakteriofagien taksonomia ja morfologia

Bakteriofagit ovat pieniä viruksia, jotka infektoivat bakteereja. Bakteriofagit voivat olla morfologialtaan monimuotoisia. Tunnetuimmat faagit ovat hännällisiä, niiden ulkomuoto koostuu pää- ja häntäosasta. Pääosassa sijaitsee kapsidi, sisältäen faagin deoksiribonukleiinihappo- (DNA) tai ribonukleiinihappo (RNA) -aineksen. Häntäosa koostuu hännän päässä olevista kuiduista, jotka kiinnittyvät aluslevyyn. Aluslevy on kiinni ytimessä ja ydintä suojaavassa osassa. Ytimen ja pääosan puolestaan yhdistää kaulus (Kuva 1).



Kuva 1. Bakteriofagien luokittelu (Mukaillen lähteistä Kiljunen 2006, Pajunen 2000 Biorender-ohjelmalla).

International Committee on Taxonomy of Viruses eli ICTV -komitea luokittelee hännälliset bakteriofagit *Caudovirales*-lahkoon (Ackermann 1998). Nämä tunnetut kaksisäikeiset hännälliset DNA-virukset voidaan jakaa *Myoviridae*-, *Siphoviridae*- ja *Podoviridae*-heimoihin. Kaksi- ja yksisäikeisiä bakteriofageja tavataan myös kuutiomaisessa (monitahkoisessa), filamenttisessa ja pleomorfisessa muodossa (Taulukko 1). Pienellä osalla faageista on lipidivaipallinen nukleokapsidi tai lipidimembraani proteiiniukuoren alla (Ackermann 1998).

Taulukko 1. Bakteriofagien luokittelu (Mukaillen lähteistä Kiljunen 2006, Pajunen 2000).

Heimo	Muoto	Lisätiedot	Nukleiinihappo	Esi- merkki
<i>Myoviridae</i>	Hännällinen	Supistuva häntä	dsDNA, lineaarinen	T4, Mu, SPO1
<i>Siphoviridae</i>	Hännällinen	Pitkä supistumaton häntä	dsDNA, lineaarinen	λ , c2, Sfi11, Sfi22
<i>Podoviridae</i>	Hännällinen	Lyhyt supistumaton häntä	dsDNA, lineaarinen	T7, T3, Φ YeO3- 12
<i>Microviridae</i>	Kuutiomainen (monitahkoinen)	Isot kapsomeerit	ssDNA, rengasmainen	Φ X174
<i>Corticoviridae</i>	Kuutiomainen (monitahkoinen)	Kompleksinen kapsidi, lipidejä	dsDNA, rengasmainen, superhelikaalinen	PM2
<i>Tectiviridae</i>	Kuutiomainen (monitahkoinen)	Vaipallinen, lipidejä, volehäntä	dsDNA, lineaarinen	PRD1
<i>Leviviridae</i>	Kuutiomainen (monitahkoinen)	Ikosahedraalinen kapsidi	ssRNA, lineaarinen	MS2, Q β
<i>Cystoviridae</i>	Kuutiomainen (monitahkoinen)	Vaipallinen, lipidejä	dsRNA, lineaarinen, segmentoitunut	Φ 6
<i>Inoviridae</i>	Filamenttinen	Pitkä filamenttinen tai lyhyt sauva	ssDNA, rengasmainen	fd

<i>Lipothrixviridae</i>	Filamenttinen	Sauva, vaipallinen, lipidejä	dsDNA, lineaarinen	TTV1
<i>Rudiviridae</i>	Filamenttinen	Suora, jäykkä sauva	dsDNA, lineaarinen	SIRV1
<i>Plasmaviridae</i>	Pleomorfinen (monimuotoi- nen)	Ei kapsidia, vaipallinen, lipidejä	dsDNA, rengasmainen, superhelikaalinen	L2
<i>Fuselloviridae</i>	Pleomorfinen (monimuotoi- nen)	Sitruunan muotoinen, vaipallinen, lipidejä, piikkejä toisella navalla	dsDNA, rengasmainen, superhelikaalinen	SSV1

4.2 Bakteriofagin endolysiinit ja elinkierto

Bakteriostaattisia ja -lyyttisiä proteiineja yritetään eristää muun muassa bakteriofageista ja näitä yritetään käyttää hyväksi resistenttejä bakteereja vastaan. Faagien tuottamia endolysiinejä (PHG, phage-encoded peptidoglycan hydrolases) on yritetty käyttää hyväksi jatkuvassa taistelussa mikrobeja vastaan. Lisäksi osa faageista tuottaa myös muita proteiineja kuten polysakkaridi depolymeraasia, holiinia ja virusperäistä peptidoglykaani hydrolaasia (VAPGH, virion-associated peptidoglycan hydrolases). Jokaisella proteiinilla on oma tehtävänsä bakteriofagin infektoidessa. VAPGH on vastuussa soluseinämän penetraation yhteydessä tapahtuvasta paikallisesta peptidoglykaanin hajoittamisesta. Polysakkaridi depolymeraasi puolestaan hajottaa hiilihydraattiryhmän makromolekyyliä ulkomembraanista, jotka auttavat bakteeria suojautumaan immuunipuolustukselta, kuivumiselta ja mikrobi-lääkkeiltä. Holiinit auttavat PHG:ta hajottamaan peptidoglykaani-soluseinän puuttumalla sytoplasmisen soluseinämän toimintaan, jolloin uudet bakteriofagit vapautuvat bakteerin hajotessa, sen sisältä, uuteen elinkiertoon (Roach & Donovan, 2015).

Bakteriofagit voidaan jakaa kahteen ryhmään elinkiertoonsa perusteella. Tällaisia faageja ovat lyyttiset ja lysogeeniset eli lauhkeat bakteriofagit. On olemassa myös kroonisen syklin omaavia faageja. Näillä faageilla on havaittu olevan neljä erilaista elinkiertoa. Lyyttiset faagit infektoivat bakteerit nukleiinihapollaan ja tuottavat niiden sisällä kopioita itsestään bakteerin avustuksella, kunnes bakteerin peptidoglykaani tuhoetaan ja kopiot aloittavat uuden elinkierron. Lysogeeniset faagit infektoivat nukleiinihappoa, joka integroituu bakteerin genomiin. Integroitunut aines voi odottaa sopivaa hetkeä tuottaa kopioita lyyttisten faagien tavoin tai se voi pysytellä bakteerin genomissa niin kutsuttuna profagina, kunnes se monistuu tätä kautta bakteerin tytärsoluun. Kroonista infektiota aiheuttavat faagit eivät replikoidu isäntäbakteerissa, vaan ne kuroutuvat ulos, hajottamatta bakteerin peptidoglykaanikerrosta (Madigan ym. 2017, Weinbauer 2004).

4.3 Bakteriofagireseptorit

Bakteriofagit ovat erittäin reseptorispesifisiä ja vain harvat niistä voivat infektoida useampaa bakteeria (Weinbauer 2004). Hännälliset faagit infektoivat perintöaineksensa soluun tunnistamalla solun pinnalla olevan reseptorin ja kiinnittymällä bakteeriin hännän karvojen avulla. Infektoimiseen tarvitaan kuitenkin montaa kuitua, esimerkiksi T4-faagi käyttää useampaa kuitua kiinnittyessään solun pintaan ja käynnistäessään biokemiallisen reaktion, jolloin nukleiinihappo siirtyy bakteeriin (Arscott & Goldberg 1976). Bakteereissa reseptoreina voivat toimia transportterin, poriinin, lipopolysakkaridin, filamentin tai piluksien erilaiset molekyylit (Weinbauer 2004). Esimerkiksi pienet kuutiomaiset faagit sitoutuvat bakteerin piluksen varteen, kun filamenttiset tarttuvat piluksen päihin. T1-faagi käyttää reseptorinaan rautaa kuljettavia proteiineja, lambda-faagi puolestaan hyödyntää maltoosia kuljettavia proteiineja ja T4-faagi tunnistaa lipopolysakkaridin pinnalla olevia sokereita (Madigan ym. 2017).

4.4 Bakteriofagien genomityypit

Bakteriofagit voidaan luokitella niiden sisältämän nukleiinihappokoostumuksen mukaan. Faagit voivat sisältää joko RNA:ta tai DNA:ta ja tämä perintöaines voi ilmentyä joko yksitai kaksijuosteisena. Virusten nukleiinihappo voi olla siis lineaarista, rengasmaista, superhelikaalista tai segmentoitunutta. Faagien geenit voivat vaihdella jopa 2.5 kb - 500 kb välillä

(Mavrich & Hatfull 2018). Tunnetuimpia faageja ovat T4-, lambda-, T3- ja T7-faagit, jotka kuuluvat hännällisiin faageihin. Faagin genomityypistä riippuen sen toiminta bakteerisolun sisällä voi olla hyvin monimuotoista. Pienet faagit saattavat tarvita isäntäbakteerin metaboliaa tuottaakseen kopioita, kun taas esimerkiksi lyyttisen T4-faagin genomi koodaa itse tarvitsemansa DNA-polymeraasin. T4-faagin genomi on monimuotoinen verrattuna pieniin faageihin ja se pystyy koodaamaan myös tarvittavia entsyymejä, kuten primaasia ja helikaasia sekä muodostamaan replikaatioon vaadittavan kahdeksan proteiinin DNA-kompleksin. T4-faagin genomi koodaa aikaisen-, keski- ja myöhäisen vaiheen proteiineja. Aikaisen vaiheen proteiinit muokkaavat isäntäbakteerin RNA-polymeraasia ja auttavat faagin genomien replikoitumisessa. Keski- ja myöhäisen vaiheen proteiinit muodostavat faagin pää- ja häntäosion sekä auttavat faagikopioita vapautumaan bakteerista. Lysogeenisen lambda-faagin genomi voi integroitua bakteerisolun genomiin tai sen genomi voi olla osana bakteerisolun plasmidia. Tämä profaagi pystyy replikoitumaan isäntäbakteerin genomissa tytärsoluun ja pysymään repressoriproteiinin avulla stabiilissa tilassa. Se voi myös transduktion avulla siirtää isäntäbakteerin geneettistä materiaalia toiseen bakteeriin. Kun stabiili vaihe päättyy ulkoisten tekijöiden seurauksena, voi lambda-faagi aloittaa myös lyyttisen kierron (Madigan ym. 2017).

5 PLASMIDIT JA VEKTORIT

Plasmidit ovat solun sisällä sijaitsevia erillisiä DNA-molekyylikomplekseja, jotka sijaitsevat gDNA:sta erillään bakteeri- tai hiivasolun sytoplasmassa. Plasmidit ovat morfologialtaan rengasmaisia tai lineaarisia ja kaksijuosteisia. Niiden koko voi vaihdella 1 kb - 1 megamäspariin (Mbp). Bakteeri voi sisältää useita erilaisia plasmideja ja niiden kopioluku voi vaihdella. Plasmidin genomien kokoa verratessa bakteerin genomien kokoon, se on usein siitä noin 5 %. Ne sisältävät tavallisesti antibioottiresistenssigeenin, joka tarjoaa isäntäsolulle antibioottiresistenssin. Plasmidit voivat kahdentua ilman solun jakautumista ja ne voivat myös siirtyä solusta toiseen luonnossa esimerkiksi konjugaation avulla. Laboratoriossa plasmideja voidaan transformoida muun muassa lämpöshokin, elektroporaation tai konjugaation avulla kompetentteihin soluihin. Kompetentit solut ovat geneettiseltä ominaisuudeltaan sellaisia, jotka pystyvät vastaanottamaan DNA:ta. Kompetenssi voi olla solulla luonnostaan tai se voidaan saada aikaiseksi laboratoriossa (Madigan 2017, Törrönen 2006).

5.1 Reportterivektorit

Reportterivektorista voidaan muodostaa plasmidi, jolla voidaan tutkia geneettisen materiaalin ominaisuuksia viemällä se solun sisälle. Plasmidi voidaan koostaa esimerkiksi eri plasmidin osista tai gDNA:sta. Vektorin reportterigeeni tuottaa tutkittavan DNA:n ilmentymisen isäntäsolussa. Yhtä plasmidia käytettäessä tarvittava toinen geeni voi sijaita isäntäsolun gDNA:ssa. Kahden plasmidin menetelmissä geneettinen materiaali sijaitsee näissä kahdessa plasmidissa, jolloin ne yhdessä tuottavat tutkittavan DNA:n reportterigeenin avustuksella isäntäsolussa (Madigan 2017, Törrönen 2006).

5.2 Itsemurhavektorit

Itsemurhaplasmidiin voidaan kloonata tutkittavaa gDNA:ta, joka viedään soluun, jossa ei ole replikaatiotekijää. Homologinen rekombinaatio vaatii RecA-proteiinin läsnäolon, sillä se auttaa liittämään luovuttajabakteerin DNA:n vastaanottajabakteerin genomiin. Tämän seurauksena plasmidin gDNA integroituu isäntäsolun genomiin (Madigan 2017, Törrönen 2006), jolloin sitä kuljettanut plasmidi tuhoutuu, kun solu jakautuu. Tätä biologista tapahtumaa kutsutaan alleelinvaihdoksi. Tässä alleelinvaihdossa ylimääräinen DNA-aines tuhoaan ja jäljelle jää genomiin vain haluttu geenin osa (Demarre ym. 2004). Kun DNA integroituu genomiin, mutta toista rekombinaatiota ei tapahdu, eli ylimääräinen DNA-aines ei tuhoudu, kutsutaan solua tällöin merodiploidiksi (Davis 1968). Geenejä voidaan viedä soluun myös useammalla itsemurhavektorilla ja niiden avulla voidaan tutkia erilaisten geenien ominaisuuksia tiettyjen seulontamenetelmien avulla (Madigan 2017).

6 REPORTTERIGEENIT JA MENETELMÄT

Reportterigeenejä käytetään ilmentämään tutkittavaa geneettistä materiaalia, joka viedään soluun esimerkiksi plasmidin avulla. Reportterigeenien avulla voidaan mitata haluttujen geenien tuottamia proteiineja. Reportterigeenit valitaan niiden havainnointiominaisuuden perusteella. Erilaisia valoa tuottavia reportterigeenejä ovat muun muassa vihreää fluoresoiva proteiini (GFP, green fluorescent protein), sinistä fluoresoiva proteiini (Aequorin),

punaista fluoresoiva proteiini (RFP, red fluorescent protein), tulikärpästen tuottama lusiferaasi (Luc, firefly luciferase) ja bioreportteri *luxCDABE* (Rowe ym. 2009, Bozcal ym. 2017). Muita reportterigeenejä ovat esimerkiksi kloramfenikoliasetyylitransferaasigeeni (CAT, Chloramphenicol Acetyl Transferase) jonka tuottama proteiini inhiboi kloramfenikolia, *lacZ*-geeni puolestaan katalysoi beetagalaktosidaasin (β -galactosidase) hydrolyysiä tuottaen sinistä väriä bakteerien pesäkkeisiin maljalla kasvatettaessa substraatti X-gal:n läsnä ollessa. Positiivisia näytteitä tai onnistunutta rekombinaatiota voidaan seuloa näillä menetelmillä muun muassa niiden tuottaman valon tai kasvun perusteella (antibiootin läsnä ollessa) sekä seulomalla pesäkkeitä värin perusteella (Madigan 2017).

6.1 Bioluminesenssi

Bioluminesenssia on monenlaista ja se on kehittynyt aikojen saatossa erilaisille eliöille ja eläimille itsenäisesti noin 30 kertaa (Wilson & Hastings 1998). Sitä voidaan käyttää muun muassa saaliiden houkuttelemiseen, pariutumiseen, suojautumiseen tai varoittamiseen. Valontuottoa tavataan erilaisilla eliöillä ja eläimillä, jotka voimme luokitella maalla tai merellä eläviin. Bioluminesenssia löytyy sekä selkärangaisista että selkärangattomista ja lisäksi sitä tuottavat erilaiset alkueliöt, sienet ja bakteerit (Rowe ym. 2009, Langley L, 2019). Valoa tuottavia bakteereja on montaa eri lajia. Luminesenssigeenit ilmentyvät monenlaisissa bakteereissa, joita voidaan jakaa moneen eri sukuun. Tällaisia sukuja ovat *Photobacterium*, *Photorhabdus*, *Aliivibrio* ja *Vibrio*. *Photobacterium*-, *Aliivibrio*- ja *Vibrio*-suvut eroavat *Photorhabdus*-suvun bakteereista siten, että ne elävät merellisessä ympäristössä, kun taas *Photorhabdus*-suvun bakteereja voidaan tavata kuivalla maalla. Yhteistä näille mikrobeille on se, että ne kaikki tarvitsevat happea tuottaakseen bioluminoivaa valoa. Merellisessä ympäristössä elävät bakteerit luokitellaan fakultatiivisiksi anaerobeiksi, mutta ne luminoivat vain hapen läsnä ollessa (Madigan 2017). *Photorhabdus luminescens* -bakteeri on tappava patogeeni hyönteisille. Se pystyy elämään symbioosissa isäntänsä sisällä, esimerkiksi madon, tuottaen samalla valoa ja infektoiden muita hyönteisiä tuottamillaan toksineilla (Rodou ym. 2010, Madigan 2017). *Aliivibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* ja *Photobacterium phosphoreum* ovat bakteereja, jotka kuuluvat *Vibriocaea*-heimoon, *Photorhabdus luminescens* -bakteeri kuuluu *Enterobacteriaceae*-heimoon. Näitä bakteereja käytetään yleisesti kliinisen lääketieteen menetelmissä. Tunnetuin luminoiva bakteeri näistä on *Vibrio harveyi*, joka elää symbioosissa kalojen, mustekalojen ja muiden organismien kanssa. Sen *lux*-operonin tuottamaa lusiferaasia on tutkittu jo lähes 40 vuotta sitten (Belas ym. 1982).

6.2 Bioluminesenssin biokemia ja luminometria

Bioluminesenssi on ATP:n avulla tapahtuva biokemiallinen prosessi, jossa tuotetaan valoa biologisten molekyylien reagoidessa keskenään. Luminometriassa mittaus perustuu ATP-molekyylin kykyyn muodostaa valoa lusiferiinin kanssa lusiferaasientsyymien katalysoimassa reaktiossa. Tässä kemiluminesenssi-prosessissa vapautuu fotoni elektronin virittyessä ja palatessa normaalitilaan, joka havaitaan valona. Lusiferaasientsyymi katalysoi lusiferiini substraatin hapettumista kosubstraatti ATP:n avulla. Reaktion kaava: lusiferiini + O₂ → eksitoitunut peroksilusiferiini → hajoamistuotteet + valo (Madigan 2017, Wilson & Hastings 1998).

6.3 Luminesenssigeenit bakteerissa

Luminesenssigeenit ilmentyvät bakteereissa *lux*-operonin avulla. Tämä operoni sisältää viisi erilaista geeniä. Näitä geenejä kutsutaan nimillä *luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD* ja *luxE*. Ne ovat järjestäytyneet operoniin *luxCDABE* järjestyksessä. Jokaisella geenin alueella on tärkeä tehtävä entsyymien tuotossa. Luminoivaa valoa syntyy, kun *luxA* ja *luxB* geenit tuottavat lusiferaasia, joka katalysoi *luxC*:n, *luxD*:n ja *luxE*:n geenituotteiden muodostamia rasvahapporeduktaaseja. Luminesenssireaktio vaatii bakteerisolussa *luxI*-säätelägeenin tuottaman AHL (acyl homo-serine lactone) -signaalimolekyylin ja *luxR*-säätelägeenin muodostaman transkriptioaktivaattorin aktivoituakseen. *luxCDABE* geenien tuotanto tehostuu näiden kahden komponentin vuorovaikutuksen johdosta (Madigan 2017, Meighen 1991). *Vibrio harveyi* -kannan luminesenssioperonin tuottama lusiferaasi on eniten tutkittu, mutta *Photurphadus luminecens* -kanta käytetään enemmän molekyylibiologisissa geenitekniikan menetelmissä, sillä sen tuottama lusiferaasi on paljon stabiilimpaa (Szittner & Meighen 1990, Trček ym. 2010).

7 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

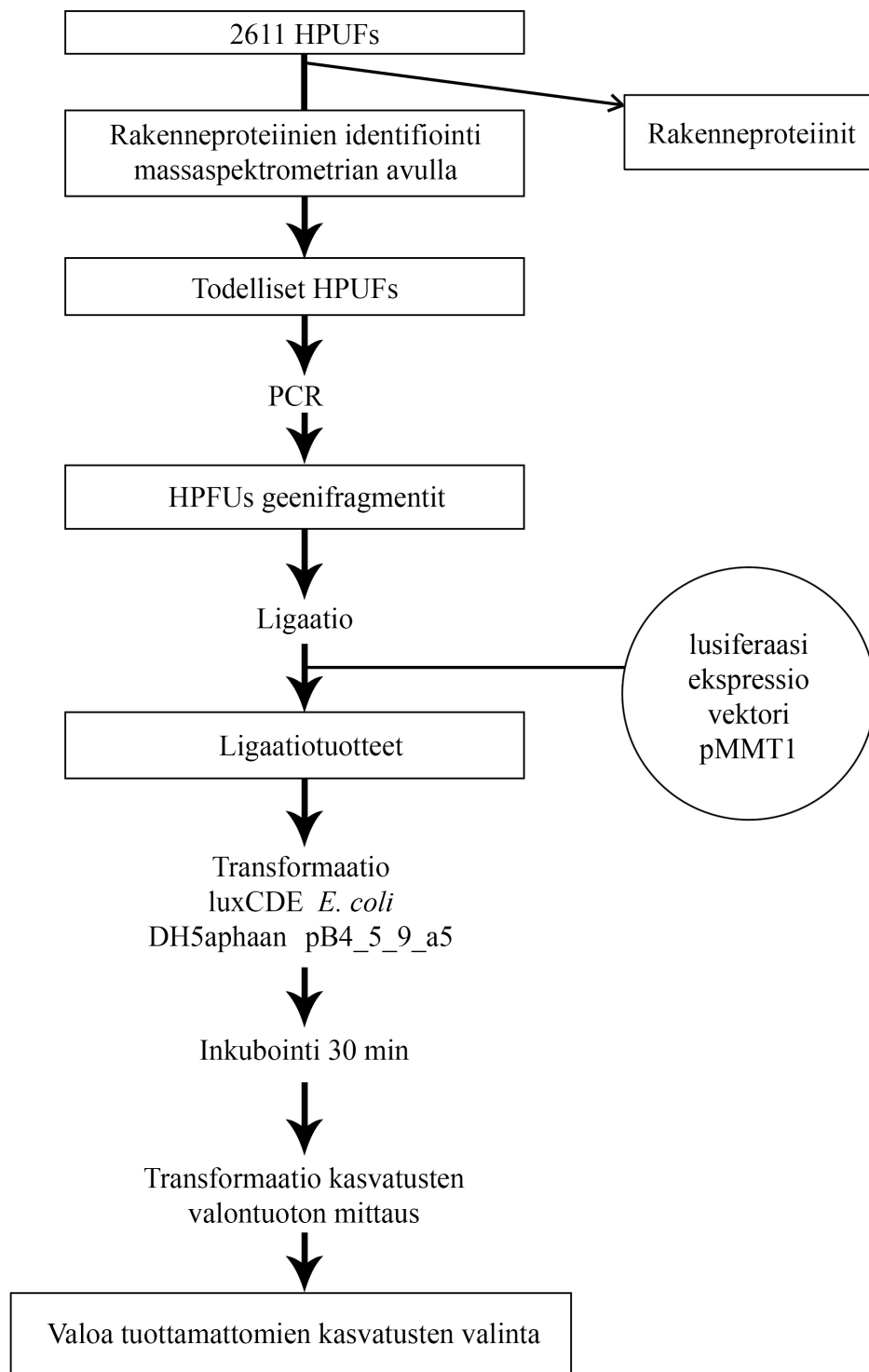
Tutkimuksen tavoitteena oli pystyttää molekyylibiologinen menetelmä, jotta voitiin tutkia tuntemattomien faagiproteiinien toimintaa ja sitä ovatko niiden tuottamat proteiinit mahdollisesti toksisia vai eivät. Tämän tutkimuksen perustana käytettiin Mikael Skurnikin tutkimusryhmän keräämää tietoa faagien geeneistä. Tutkimukseen valituista 15 erilaisesta bakteriofagista ja niiden 2610 bakteriofagigeenistä tuntemattomia oli 1770. Tämä tarkoitti sitä, että 67.8 % faagien geeneistä toimivat tuntemattomalla tavalla ja tuottavat hypoteettisia proteiineja, joiden toiminta on tuntematonta (Taulukko 2).

Taulukko 2. Tuntemattomat bakteriofagigeenit. *HPUFs (Hypothetical Proteins of Unknown Function) = Hypoteettiset proteiineja tuottavat tuntemattomat geenit (Maria Pajunen, Helsingin yliopisto, henkilökohtainen tiedonanto 21.5.2019).

Faagin nimi	Isäntäbakteeri	Faagin heimo	Viite-numero	Genomin koko (kb)	Geenit/ HPUFs*	% tuntematonta
fFI-Eco01	<i>Escherichia coli</i>	<i>Podovirus</i>		40.9	53/24	45.3
fTA-Eco01	<i>Escherichia coli</i>	<i>Siphovirus</i>		41.5	69/54	78.3
fHE-Kpn01	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Podovirus</i>		43.4	57/43	75.4
fPO-Eco02	<i>Escherichia coli</i>	<i>Siphovirus</i>		44.7	75/63	84.0
fRO-Kpn03	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Siphovirus</i>		49.3	77/51	66.2
fHY-Eco03	<i>Escherichia coli</i>	<i>Myovirus</i>		53.6	80/66	82.5
R2-01	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Siphovirus</i>	HE 956708	112.8	165/140	84.8
fHE-Yen9-01	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Myovirus</i>	KY 593455	168.0	271/150	55.4
R1-RT	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Myovirus</i>	HE 956709	168.8	262/147	56.1
fTu-Ecl01	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Myovirus</i>		179.0	281/173	61.6
fHE-Yen9-04	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Myovirus</i>	LT 960551	354.7	538/442	82.1
Stab21	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Myovirus</i>		153.8	238/203	85.3

fHo-Efm02	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Podovirus</i>		33.4	46/32	69.6
fHo-Efm06	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Myovirus</i>		161.5	197/137	69.5
Fmali-09	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Siphovirus</i>		40.2	65/45	69.2
				Sum	2611/1770	67.8

Menetelmässä haluttiin, että reportterin toinen osa olisi plasmidissa (*luxAB*) ja toinen osa genomissa (*luxCDE*), näin reportteriplasmidiin voitaisiin kloonata tutkittavat faagigeenit. Kaikkien viiden *lux*-geenin (*luxAB*, *luxCDE*) vaikuttaessa samassa bakteerisolussa *luxCDE*-geenit tuottavat substraatin *luxAB*-geenien tuottamalle lusiferaasi-entsyymille. Valoa syntyy lusiferaasin avulla, toksinen geeni *luxAB*-plasmidissa estää lusiferaasin tuoton, jolloin valoa ei synny. Menetelmän pystyttämisen päämääränä oli seuloa tuntemattomia geenejä, jotka eivät mahdollistaneet valon tuottoa bakteerissa, ja jotka tuottaisivat mahdollisesti toksisia proteiineja (Kuva 2).



Kuva 2. Menetelmän pystyttämisen prosessi *HPUFs:sta (Hypothetical Proteins of Unknown Function) toksisia proteiineja tuottavien geenien seulontaan.

8 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

8.1 Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat ja niiden kasvatus

Tutkimuksessa käytettiin tutkimusryhmän kantakokoelman bakteerikantoja (Taulukko 3). Bakteerikannat siirrostettiin maljoille pakkasessa (-70 °C) olevasta glyserolikantakokoelmasta (Tryptone Soya broth-kasvatusliuos (TSB), josta 20 % v/v glyserolia). Bakteerikantojen kasvatukset suoritettiin malja- tai nestekasvatuksina sekä niiden yhdistelmänä. Maljakasvatukset tehtiin Luria agar -maljoilla (LA), joihin oli käytetty Lysogeny broth -lientä ja agaria (Liite 1). Nestekasvatuksiin käytettiin Lysogeny broth -lientä (LB) (Liite 1) ja Erlenmeyer-pulloa (500 ml) tai Falcon®-putkea (15 ml) joita pidettiin ravistelussa 200 rpm (+30 °C tai +37 °C) tai 40 rpm (huoneenlämmössä eli RT). Nestekasvatusten inkubointiin käytettiin kahta erilaista ravistelulaitetta (Liite 2). Bakteereja kasvatettiin aerobisesti ilman antibioottia tai sen läsnä ollessa bakteerin ominaisuuksista riippuen. Tarvittaessa lisättiin kasvualustoille ampisilliiniä 100 µg/ml tai 250 µg/ml (Amp, REF A0166, Sigma-Aldrich), kanamysiiniä 50 µg/ml (Km, REF 420311-25GM, Calbiochem), kloramfenikolia 20 µg/ml (Clm, REF C0378, Sigma-Aldrich), streptomysiiniä 50 µg/ml (Strept, REF S-6501, Sigma-Aldrich) sekä diaminopimeliinihappoa 0,3 mM (DAP, REF B22391, Alfa Aesar). Kasvatustilapötiloina käytettiin bakteerille suotuisia lämpötiloja (*E. coli* +37 °C, *Y. enterocolica* RT). Maljalle siirrostettua *E. coli* -bakteeria kasvatettiin 1 vrk tai 2 vrk ja *Y. enterocolitica* -bakteeria 2 vrk. Molempien bakteerien liemikasvatuksia inkuboitii 1 vrk, lukuun ottamatta nuorennoskasvatuksia.

Transformaation jälkeen *E. coli* -kantojen nuorennoskasvatus tehtiin kasvattamalla bakteereja LB-liemessä ilman antibioottia (+37 °C, 220 rpm, yön yli), jonka jälkeen bakteerikantaa (5 ml) nuorennettiin ensimmäisen kerran 1:50 ja annettiin kasvaa (+30 °C, 220 rpm) 2 vrk. Tämän jälkeen tehtiin toinen nuorennos 1:50 +37 °C, 220 rpm, 1 vrk. Kolmatta nuorennosta kasvatettiin +37 °C, 220 rpm, noin 5,5 h.

Taulukko 3. Työssä käytetyt bakteerikannat listattuna työvaiheittain.

Kanta kokoelma numero	Laji ja serotyyppi	Plasmidi/gDNA	Antibiootti resistenssi	Käyttötarkoitus pMMT1-plasmidin valmistuksessa	Julkaisu/saatu
#6557	<i>E. coli</i> DH10B	pUC19	AmpR	pUC19-vektori	Pajunen M/Invitrogen
#4732	<i>E. coli</i> DH10B	pTetlux1	AmpR	<i>luxAB</i> -insertti	Korpela ym. (1998)
#5610	<i>E. coli</i> DH10B	pTetlux1-CDE-AB (Vain CDE)	AmpR	Digestiokontrolli (<i>luxCDE</i>)	Bozcal ym. (2017)
#1254	<i>Y. enterocolitica</i> O:3	pYVO:3		gDNA-insertti	Skurnik (1984) / Pajunen M
Kanta kokoelma numero	Laji ja serotyyppi	Plasmidi/gDNA	Antibiootti resistenssi	Käyttötarkoitus gDNA palan siirrossa	Julkaisu/saatu
#6557	<i>E. coli</i> DH10B	pUC19	AmpR	pUC19-vektori	Pajunen M/Invitrogen
#2689	<i>E. coli</i> DH10B	gDNA		gDNA-insertti	Pajunen M
Kanta kokoelma numero	Laji ja serotyyppi	Plasmidi/gDNA	Antibiootti resistenssi	Käyttötarkoitus <i>luxCDE</i> -palan insertoinnissa	Julkaisu/saatu
#5610	<i>E. coli</i> DH10B	pTetlux1-CDE-AB (Vain CDE)	AmpR	<i>luxCDE</i> -insertti	Bozcal ym. (2017)
Kanta kokoelma numero	Laji ja serotyyppi	Plasmidi/gDNA	Antibiootti resistenssi	Käyttötarkoitus insertin siirrossa pSW23T-vektoriin	Julkaisu/saatu
#5038	<i>E. coli</i> BW19610	pSW23T	ClmR	pSW23T-itsemurha-vektori	Babic ym. (2008)
#5083	<i>E. coli</i> BW19610	pSW25T	SpeR	pSW25T-itsemurhavektori-kontrolli	Mazel D.
#5005	<i>E. coli</i> ω 7249		ClmR (+DAP)	Elektrokompetentit solut	Babic ym. (2008)
#1434	<i>E. coli</i> Sy327 λ pir			Elektrokompetentit solut	Miller & Mekalanos (1988)

Kanta kokoelma numero	Laji ja serotyyppi	Plasmidi/gDNA	Antibiootti resistenssi	Käyttötarkoitus itsemurhaplasmidin konjugaatiossa	Julkaisu/saatu
#6152	<i>E. coli</i> ω 7249 B4/5/5, B4/5/9, B4/5/12	pB4_5_5, pB4_5_9, pB4_5_12	ClmR (+DAP)	Konjugaation donori	Tämä työ
	<i>E. coli</i> DH5alpha			Konjugaation resipientti	Invitrogen
Kanta kokoelma numero	Laji ja serotyyppi	Plasmidi/gDNA	Antibiootti resistenssi	Käyttötarkoitus pMMT1-plasmidin valon tuoton testauksessa	Julkaisu
#6539	<i>E. coli</i> DH5alpha B4/5/9/a5	pB4_5_9_a5	ClmR	Elektrokompetentit solut	Tämä työ
#1255	<i>Y. enterocolitica</i> O:3			Negatiivinen kontrolli	Skurnik (1984)
#6152	<i>E. coli</i> DH5alpha			Negatiivinen kontrolli	Invitrogen
#6141	<i>Y. enterocolitica</i> O:3	plux232ot <i>Provm</i>	KmR	Matala positiivinen kontrolli	Leskinen ym. (2017)
#5455	<i>Y. enterocolitica</i> O:3	plux232ot <i>Pps</i>	KmR	Korkea positiivinen kontrolli	Leskinen ym. (2015)
Kanta kokoelma numero	Laji ja serotyyppi	Plasmidi/gDNA	Antibiootti resistenssi	Käyttötarkoitus valon tuoton standardisoinnissa	Julkaisu
#5958	<i>E. coli</i> Sy327/pEfB6	pSW23T	ClmR	Elektrokompetentit solut ja negatiivinen kontrolli	Bozcal ym. (2017)
#5963	<i>E. coli</i> Sy327/pEfB7-a	pKNG101	StrepR	Elektrokompetentit solut ja negatiivinen kontrolli	Bozcal ym. (2017)
#1434	<i>E. coli</i> Sy327 λ pir			Negatiivinen kontrolli	Miller & Mekalanos (1988)
#6141	<i>Y. enterocolitica</i> O:3	plux232ot <i>Provm</i>	KmR	Matala positiivinen kontrolli	Leskinen ym. (2017)
#5455	<i>Y. enterocolitica</i> O:3	plux232ot <i>Pps</i>	KmR	Korkea positiivinen kontrolli	Leskinen ym. (2015)

8.2 Työssä käytetyt plasmidit, gDNA ja niiden eristys

Plasmidin eristykset tehtiin kantakokoelman bakteereista (Taulukko 3) NucleoBond Xtra Midi/Maxi- ja NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuotteilla (Macherey-Nagel) valmistajan ohjeiden mukaisesti. NucleoBond Xtra Midi -eristyksessä käytettyjen liemikasvatusten tilavuudet olivat 100 ml, jotka sentrifugoitiin kahdessa 50 ml Falcon®-putkessa 3645 xg, 15 min +4 °C Eppendorf Centrifuge 5804 R -laitteella (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Liite 2). NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuotteella eristettyjen bakteerikasvatusten tilavuudet olivat 5 ml ja ne sentrifugoitiin ensin 15 ml Falcon®-putkessa 3645 xg, 10 min, +4 °C Eppendorf Centrifuge 5804 R -laitteella, jonka jälkeen sentrifugointi tapahtui 1,5 ml Eppendorf®-putkissa Eppendorf Centrifuge 5415 R -laitteella (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Liite 2) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Plasmidien eristyksissä suoritettiin ylimääräiset puhdistukset ohjeen mukaan. gDNA-näytteet olivat valmiiksi eristettyjä (Maria Pajunen). Näytteet olivat eristetty kaupallisella Jet-Flex Genomic DNA Purification Kits -tuotteella (Genomed, REF 600500). Näytteiden DNA-konsentraatiot mitattiin Nanodrop ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer -laitteella (NanoDrop Technologies Inc., Liite 2) eristysten jälkeen.

8.3 Koedigestiot ja vektoreiden sekä inserttien digestointi

Plasmidien tarkistus tapahtui ensin määrittämällä entsyymien katkaisukohdat virtuaalisesti NEBcutter V2.0 -ohjelmalla (Vincze ym. 2003) ja tämän jälkeen koedigestioiden avulla valmistajien ohjeiden mukaisesti. Työssä käytimme monia eri entsyymejä ja niiden yhdistelmiä (Taulukko 4). Vektorit ja insertit digestoitiin inkuboimalla näytteitä +37 °C 1 h, 2 h tai yön yli, jonka jälkeen näytteet inaktivoitiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Digestion jälkeen osa näytteistä käsiteltiin alkalisella fosfataasilla (AP) valmistajan (FastAP Alkaline Phosphatase 1U/μl, Thermo Scientific) ohjeiden mukaisesti, jotta fosfaatit saatiin poistettua katkenneiden tuotteiden päistä.

Taulukko 4. Työssä käytetyt entsyymit.

Entsyymi ja pitoisuus (jos ilmoitettu)	REF numero	Valmistaja
<i>Bam</i> HI-HF 20 000 U/ml	R3136S	Biolabs Inc. New England
<i>Eco</i> RI-HF 20 000 U/ml	R3101S	Biolabs Inc. New England
<i>Hind</i> III 10 U/ μ L	ER0505	Thermo Scientific. United States
<i>Mfe</i> I 10 U/ μ L	ER0751	Thermo Scientific. United States
<i>Pae</i> I	FD0604	Thermo Scientific. United States
<i>Rru</i> I	FD2154	Thermo Scientific. United States
<i>Sal</i> I-HF 20 000 U/ml	R3138S	Biolabs Inc. New England
<i>Sca</i> I	FD0434	Thermo Scientific. United States
<i>Xba</i> I	FD0685	Thermo Scientific. United States
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase 1 U/ μ L	EF0654	Thermo Scientific. United States

8.4 Agaroosigeelielektroforeesi

Koedigestioiden ja polymeraasiketjurektion (PCR) tulokset havainnoitiin 1 % agaroosigeeliltä. LE-agarose-jauhe (SeaKem LE agarose, Lonza REF 50005) sekoitettiin 1 x TAE-puskuriin, johon lisättiin DNA:han sitoutuvaa Midori Green väriainetta (Midori Green Direct, Nippon Genetics, REF MG06) valmistajien ohjeiden mukaisesti. Vektorien ja inserttien puhdistus tehtiin ajamalla ne 1.2 % preparatiiviseen geeliin, joka valmistettiin kuten yllä GTG-agarose-jauheesta (SeaPlaque GTG agarose, Lonza REF 50110) ja leikkaamalla haluttu DNA-fragmentti talteen. DNA-näytteet pipetoitiin kaivoihin 10XFD green buffer- (Thermo Scientific, REF B72) tai 6X loading Dye -latauspuskurin kanssa (Liite 1). Molekyylipainomarkkerina käytettiin kaikissa agaroosigeeleissä Thermo Scientificin GeneRuler 1 kb DNA Ladder:ia (0.1 μ g/ μ l REF SM0313). 1 % agaroosigeeliä ajettiin 1 h, 80 V sähkövirrassa ja preparatiivista 1.2 % geeliä n. 3,5 h, 60 V sähkövirrassa 1 X TAE-puskurissa (Liite 1) Electrophoresis Power Supply EPS 301 -laitteella (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Liite 2). Ajon jälkeen geeli kuvattiin Gel DocTM XR+ Molecular Image -laitteella (Bio-Rad Laboratories Inc., Liite 2).

8.5 DNA-tuotteiden puhdistus

Kaikki työssä käytetyt PCR-tuotteet, digestioiden fragmentit ja preparatiiviselta geeliltä talteen leikatut DNA-tuotteet puhdistettiin NucleoSpin® Gel and PCR Clean up -tuotteella (Macherey-Nagel) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Tuotteiden puhdistuksessa käytettiin Eppendorf Centrifuge 5415 R -laitetta. Puhdistuksessa suoritettiin kaksi pesua valmistajan ohjeen mukaan. Näytteiden DNA-konsentraatiot varmistettiin Nanodrop ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer -laitteella puhdistusten jälkeen.

8.6 Työssä käytetyt alukkeet ja PCR

PCR-alukkeet suunniteltiin tutkimusryhmässä Primer3 v.0.4.0 -ohjelmalla (Untergasser ym. 2012). Kaikki alukkeet tilattiin Metabion Oy Ag:lta lukuun ottamatta pUC19 F- ja pUC19 R-alukkeita, jotka saatiin lahjoituksena Suomen puolustusvoimien analyysilaboratoriolta (Taulukko 5).

Taulukko 5. Työssä käytetyt alukkeet 5'-3'suunnassa työvaiheittain.

Alukkeen nimi	Sekvenssi 5'-3'	Käyttötarkoitus pMMT1-plasmidin valmistuksessa
lux2 F	cgc gaa ttc act caa ata gca ata taa gga ctc t	<i>lux-CDE</i> palan kloonaukseen pTetlux1-plasmidista
lux2 R	cgc gga tcc ttc aag ctg ctg ctt tgt tg	<i>lux-CDE</i> palan kloonaukseen pTetlux1-plasmidista
pHigh1-FS pHigh1-RE	cgg gtc gac gtt caa aac gtt cgg gat gt cgg cga att cgg tca agt ttg ttg ccg tct	gYeO:3-palan kloonaukseen gYeO:3-palan kloonaukseen
Alukkeen nimi	Sekvenssi 5'-3'	Tulosten havainnointi (pMMT1-plasmidin)
lux2 F	cgc gaa ttc act caa ata gca ata taa gga ctc t	pMMT1-plasmidin sekvensointi
pHigh1-RE	cgg cga att cgg tca agt ttg ttg ccg tct	pMMT1-plasmidin sekvensointi
pUC19 F	cct ctt cgc tat tac gcc ag	pMMT1-plasmidin sekvensointi
pUC19 R	caa cgc aat taa tgt gag tta gct	pMMT1-plasmidin sekvensointi
Alukkeen nimi	Sekvenssi 5'-3'	Käyttötarkoitus itsemurhavektorin valmistuksessa
folAfb	ggc gga tcc att gta atg cgg cga gtc c	A-plasmidin DH10B gDNA:n kloonaukseen

RS00255fB	ggc gga tcc gct gca aat cga cga aga g	A-plasmidin DH10B gDNA:n kloonaus
RS10080fB	ggc gga tcc atc ctc tcc atc gca tcc t	B-plasmidin DH10B gDNA:n kloonaus
HptXfB	ggc gga tcc gct ctt cct gct aac gaa c	B-plasmidin DH10B gDNA:n kloonaus
RS10195fS	gcc gtc gac agc tgc cca ctt cca ctt at	C-plasmidin DH10B gDNA:n kloonaus
KHGfS	gcg gtc gac ttc tgg aag tga ctc tgc gt	C-plasmidin DH10B gDNA:n kloonaus
RS07420fB	ggc gga tcc acg gat gca ggc gaa att a	D-plasmidin DH10B gDNA:n kloonaus
2CysfB	ggc gga tcc aaa ccg ttc att tcc agg gc	D-plasmidin DH10B gDNA:n kloonaus
RS00255rM	ggc caa ttg ggc tgt gtt taa gac gcc	A-plasmidin käänteinen PCR <i>luxCDE</i> -palan insertointi
folArM	gcc caa ttg gat ata gga agg ccg gat aa	A-plasmidin käänteinen PCR <i>luxCDE</i> -palan insertointi
HptXrM	ggc caa ttg cat att act tca ggt att cac c	B-plasmidin käänteinen PCR <i>luxCDE</i> -palan insertointi
RS10080rM	ggc caa ttg aag taa ata cta aaa agc gcg t	B-plasmidin käänteinen PCR <i>luxCDE</i> -palan insertointi
KHGrM	ggc caa ttg act ttt aca gct tag cgc c	C-plasmidin käänteinen PCR <i>luxCDE</i> -palan insertointi
RS10195rM	ggc caa ttg tca aaa tgc ccg atc gag g	C-plasmidin käänteinen PCR <i>luxCDE</i> -palan insertointi
2CysrE	ggc gaa ttc agg cat att aaa tta tgc tt	D-plasmidin käänteinen PCR <i>luxCDE</i> -palan insertointi
RS07420rE	ggc gaa ttc gat ggt gtt gca cca tca	D-plasmidin käänteinen PCR <i>luxCDE</i> -palan insertointi
Alukkeen nimi	Sekvenssi 5'-3	Käyttötarkoitus itsemurhavektorin tulosten havainnoinnissa
Lux-FE	cgg gaa ttc agt tac agg cca gga acc a	1. <i>luxCDE</i> -palan havainnointi pB4_5_5, pB4_5_9, pB4_5_12-plasmideista 2. <i>luxCDE</i> -palan havainnointi konjugation pesäke PCR:sta
luxc-r	tcc cca agc gac aat aac at	1. <i>luxCDE</i> -palan havainnointi pB4_5_5, pB4_5_9, pB4_5_12-plasmideista 2. <i>luxCDE</i> -palan havainnointi konjugation pesäke PCR:sta 3. <i>luxCDE</i> -palan havainnointi B4/5/5 a ja b, B4/5/9 a ja b, B4/5/12 a ja b pesäkkeistä (nuorennos 3. Clm-herkät) 4. pB4_5- ja pB4_5_9-plasmidin sekvensointi
RS10080-F2	cgt ttt cgt ttc tgg gcg ata tgt tt	Merodiploidin varmistus 1-aluke
luxE-F	ttg taa gtg gaa tgc ttg cg	Merodiploidin varmistus 1-aluke

RS10080fB	ggc gga tcc atc ctc tcc atc gca tcc t	1. Merodiploidin varmistus 2-aluke 2. pB4_5- ja pB4_5_9-plasmidin sekvensointi
luxE-F	ttg taa gtg gaa tgc ttg cg	Merodiploidin varmistus 2-aluke
luxC-R	tcc cca agc gac aat aac at	Merodiploidin varmistus 3-aluke
HptXfB	ggc gga tcc gct ctt cct gct aac gaa c	1. Merodiploidin varmistus 3-aluke 2. pB4_5- ja pB4_5_9-plasmidin sekvensointi
luxC-R	tcc cca agc gac aat aac at	Merodiploidin varmistus 4-aluke
HptX-F2	agt cgc gta acc cat acg at	Merodiploidin varmistus 4-aluke
luxC-R2	gtg gtt cct ggc ctg taa ct	Merodiploidin varmistus 5-aluke
HptXfB	ggc gga tcc gct ctt cct gct aac gaa c	Merodiploidin varmistus 5-aluke
luxC-R2	gtg gtt cct ggc ctg taa ct	Merodiploidin varmistus 6-aluke
HptX-F2	agt cgc gta acc cat acg at	Merodiploidin varmistus 6-aluke
luxC-R	tcc cca agc gac aat aac at	Merodiploidin varmistus 7-aluke (kontrolli)
luxC-F2	agt tac agg cca gga acc ac	Merodiploidin varmistus 7-aluke (kontrolli)
pSW-R		pB4_5- ja pB4_5_9-plasmidin sekvensointi

Työssä käytettiin kahta DNA-polymeraasia ja reaktioseosta (Taulukko 6) sekä kahta PCR-ohjelmaa (Taulukko 7). Plasmidit, niiden osat ja gDNA:t monistettiin gradientilla PCR:lla Phusion High-Fidelity DNA Polymeraasilla (2 U/ μ L, Thermo Scientific, REF: F530S). DyNAzyme II DNA Polymeraasia (2 U/ μ L, Thermo Scientific, REF: F-501S) käytettiin pesäke-PCR:n tulosten tarkistamiseen, jossa siirrostettiin DNA:ta suoraan pesäkkeestä reaktioseokseen. Kaikissa PCR:ssa käytettiin iCycler™ Thermal Cycler -laitetta (Bio-Rad Laboratories Inc., Liite 2).

Taulukko 6. PCR:n lopulliset pitoisuudet.

Ainesosat	Gradientti-PCR (50 μ l)	Pesäke-PCR (50 μ l)
Templaatti	~10 ng (DNA)	~0,5 pesäke (DNA)
Reaktiopuskuri	1X (5X HF buffer)	1X (10X Opt. DyNAz. buffer)
dNTP-liuos 10 mM	200 μ M each	200 μ M each
Aluke F	0,5 μ M	0,5 μ M
Aluke R	0,5 μ M	0,5 μ M
Polymeraasi	0,02 U/ μ l Phusion	0,02 U/ μ l DyNAzyme II
H ₂ O	Täyttö lopulliseen tilavuuteen	Täyttö lopulliseen tilavuuteen

Taulukko 7. Työssä käytetyt PCR-ohjelmat.

Syklit	Lämpötila ja aika	Gradientin PCR:n vaiheet (1-4)
x 1	30 s +98 °C	1. Alkudenaturaatio
x 25	10 s +98 °C	2. Denaturaatio
	30 s +60 - 72 °C	Alukkeiden liittyminen
	15 s - 2 min +72 °C	DNA:n polymerisaatio eli ekstensioaika
x 1	10 min +72 °C	3. DNA:n polymerisaatio
x 1	∞ min +4 °C	4. Loppusäilytys
Syklit	Lämpötila ja aika	Pesäke-PCR:n vaiheet (1-4)
x 1	3 min +94 °C	1. Alkudenaturaatio
x 30	30 s +94 °C	2. Denaturaatio
	30 s +55 °C	Alukkeiden liittyminen
	2 min +72 °C	DNA:n polymerisaatio eli ekstensioaika
x 1	10 min +72 °C	3. DNA:n polymerisaatio
x 1	∞ min +4 °C	4. Loppusäilytys

8.7 Plasmidien sekvensointi

Plasmidien sekvenssit koottiin virtuaalisesti ja digestoitii NEBCutter 2.0 -ohjelmalla (Vincze ym. 2003). Palojen näyttäessä oikean kokoisilta agaroosigeelleillä ne lähetettiin sekvensoitavaksi Suomen molekyylilääketieteen instituutin Teknologiakeskuksen Sekvensointiyksikköön (FIMM) valitsemillamme alukkeilla (Taulukko 5). FIMM:stä saimme plasmidin todellisen sekvenssin Fasta-tiedostona.

8.8 Elektroporaatio ja transformaatio

Elektrokompetentit bakteerisolut valmistettiin mukaillen tunnettua menetelmää (Lamberg ym. 2002.). Solujen valmistuksessa siirrostettiin yön yli kasvaneesta 50 ml bakteerikantaliuoksesta 1 ml 500 ml:aan S.O.B -liuosta (Liite 1) 2 L Erlenmeyer-pulloon. Soluja kasvatettiin A_{600} 0.6 -0.8 jonka jälkeen ne siirrettiin jäälle. Soluja sentrifugoitiin ensimmäisellä kerralla 1634 xg, 10 min, +4 °C ja kahdella seuraavalla kerralla 1442 xg, 15 min, +4 °C. Solujen sentrifugoinnissa käytettiin Avanti J-26 XPI centrifuge -laitetta (Beckman Coulter Inc., Liite 2). Sentrifugointien välissä suoritettiin solujen pesu 10 % glyserolilla (Liite 1). Lopuksi elektrokompetentit solut siirrettiin Eppendorf®-putkissa nestetyppeen, josta ne säilöttiin -70 °C:een. Solujen toimivuus testattiin elektroporaatiossa kontrolliplasmidin avulla ja laskemalla transformaation tehokkuus. Solukontrollin avulla varmistettiin, etteivät

solut olleet kontaminoituneet prosessin aikana. Plasmidi-DNA siirrettiin elektrokompetentteihin soluihin elektroporaation avulla Gene Pulser II Apparatus-/Pulse Controller Plus -laitteella (Bio-Rad Laboratories Inc., Liite 2). Resistanssi oli 200 Ω , kapasitanssi 25 μF ja jännite 2,5 kV. Elektroporaatiossa käytettiin 0,2 cm kyvettejä, joihin pipetoitiin 45 μl soluja ja plasmidia ~25 ng / elektroporaatio. Sähköshokki annettiin noin 4,5 ms ajan. Soluja kasvatettiin +37 °C, 1 h, FINEPCR AG Rotator -rotaatoravistelulaitteessa (Finemould Precision Ind. Co., Liite 2). Elektroporoidut solut siirrostettiin maljoille saman protokollan mukaisesti (jokaista näytettä 10 μl , 100 μl ja loput solut) sopivan antibiootin läsnä ollessa ottaen huomioon isäntäbakteerin ja plasmidin ominaisuudet.

8.9 Transformanttien seulonta

Transformanttien seulontaan käytettiin eri menetelmiä. Ensimmäisessä menetelmässä pesäkkeistä tehtiin plasmidin eristys edellä mainitulla NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuotteella ja sen jälkeen koedigestiot. Toisissa menetelmissä transformantteja seulottiin joko pesäke-PCR:n avulla tai Siri-menetelmällä (Siri's -method, Beuken ym. 1998), jonka avulla tarkistettiin bakteerin sisältämä plasmidi. Siri-menetelmässä pesäkkeestä siirrostettuja bakteereita kasvatettiin Falcon®-putkessa (15 ml) LB-liemessä (5 ml) ravistelussa 200 rpm yön yli tai noin 3 h, +37 °C Certomat IS -inkubaattorissa (B. Braun Biotech International Ag., Liite 2). Näytteet siirrettiin jälle ja tämän jälkeen niistä otettiin 500 μl , joka sentrifugoitiin Eppendorf Centrifuge 5415 R -laitteella 16 000 xg, 1 min, RT. Pelletin päälle muodostunut supernatantti pipetoitiin pois ja pelletti suspensoitiin 100 μl H₂O. Tämän jälkeen suspensioon lisättiin 100 μl fenolikloroformiseos (1:1) ja näytettä vorteksoitiin noin 10 s. Näyte sentrifugoitiin 16 000 xg, 3 min, RT. Näytteeseen muodostuneesta yläfaasista pipetoitiin talteen 10 μl uuteen Eppendorf®-putkeen, johon lisättiin RNAasia sisältävää Resuspension Buffer -tuotetta 1 μl (NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuote, Macherey-Nagel) ja 6XLoading Dye -bufferia 1 μl (Liite 1). Tämän jälkeen seos ladattiin 1 % agarosigeelille elektroforeesiajoa varten. Geeliltä voitiin havainnoida sekä gDNA että mahdollinen plasmidi.

8.10 Konjugaatio

Konjugaatio tehtiin protokollan mukaisesti (Biezka-Sarek ym. 2005). Luovuttajakantojen (*E. coli* ω 7249 B4/5/5, B4/5/9, B4/5/12) ja vastaanottajakannan (#6152 *E. coli* DH5alpha, Taulukko 3) bakteeripesäkkeet siirrostettiin LA-maljoilta Falcon®-putkeen 15 ml LB-liemeen 5 ml kasvamaan +37 °C, 200 rpm, yön yli. Luovuttajakantojen LB-liemi inkuboitui antibiootin kanssa (CIm 20 µg/ml + DAP 0,3 mM). Näytteet siirrettiin jälle ja tämän jälkeen ne sentrifugoitiin 1620 xg, 10 min, RT. Bakterisolupelletit pestiin kolme kertaa fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS pH 7.4) 5 ml ja sentrifugoitiin kuten edellä. Solususpensioiden OD₆₀₀-arvot mitattiin Eppendorf BioPhotometer -laitteella (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Liite 1) ja ne laimennettiin OD₆₀₀-arvoon ~1. LA-maljalle pipetoitiin DAP 0,3 mM läsnä ollessa ensin vastaanottajabakteerin solususpensiota 50 µl ja tämän jälkeen luovuttajabakteerin solususpensiota 50 µl samaan kohtaan. Maljat siirrettiin inkuboitumaan +37 °C, yön yli. Yöllä muodostuneiden bakterikasvustojen päälle pipetoitiin PBS-liuosta ja bakteerit irroitettiin kasvatusalustasta kulmasauvan avulla. Bakterisuspensio siirrettiin maljalta pipetoimalla Eppendorf®-putkeen. Bakterisolut pestiin kolme kertaa PBS-liuoksella 1 ml ja sentrifugoitiin jokaisen pesun jälkeen 3300 xg, 5 min, RT. Tämän jälkeen solupelletti suspensioitiin PBS-liuokseen 1 ml. Bakterikannasta tehtiin 10⁻¹-laimennos, josta viljeltiin 100 µl näytettä LA-maljalle (CIm 20 µg/ml). Bakteereja kasvatettiin noin 23 °C 2 vrk ja tämän jälkeen +37 °C 1 vrk. Kasvaneista erillispesäkkeistä viljeltiin puhdasviljelmät, joita inkuboitui +37 °C, noin 2 vrk.

8.11 Ligaatit

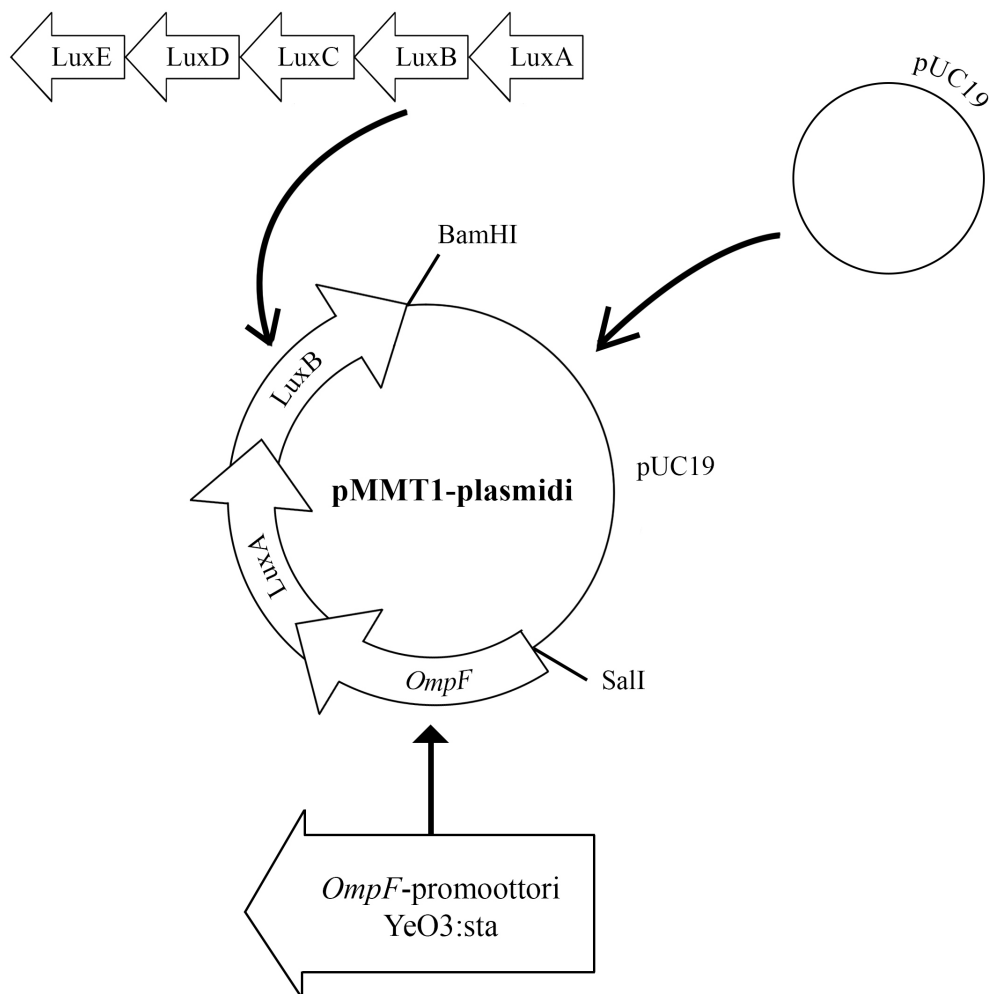
Ligaatioissa inserttejä ja vektoria lisättiin suhteissa 3:1, ~1:1 tai 1:1 (Taulukko 8). Vektori ja insertit liitettiin yhteen T4 DNA-ligaasilla (T4 DNA Ligase 400 000 U/ml, Biolabs Inc. M0202S). Ligaatit tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Taulukko 8. Työssä käytetyt ligaatiot. pMMT1-ligaatiossa vektorifragmenttina pUC19 (digestio *SalI* ja *BamHI*), inserttifragmentit YeO:3 (digestio *EcoRI* ja *SalI*) ja pTetlux1 (digestio *EcoRI* ja *BamHI*). pB4-ligaatiossa vektorifragmenttina pUC19 (digestio *BamHI*) ja inserttifragmenttina gDNA DH10B (digestio *BamHI*). pB4_5-ligaatiossa vektorifragmenttina pUC19, jossa gDH10B (digestio *MfeI*) sekä inserttifragmenttina *luxCDE* (digestio *EcoRI*). pB4_5_9-ligaatiossa vektorifragmenttina itsemurhaplasmidi pSW23T (digestio *BamHI*) ja inserttifragmenttina gDH10B, jonka keskellä *luxCDE* (digestio *BamHI*).

Ligaatioiden ainesosat (15 µl)	pMMT1-ligaatio pUC19 + YeO:3 + <i>luxAB</i> (pTetlux1)	pB4-ligaatio pUC19 + gDNA DH10B	pB4_5-ligaatio pUC19+ gDH10B + <i>luxCDE</i>	pB4_5_9-ligaatio pSW23T + <i>luxCDE</i> +gDH10B
Vektori	1X (50 ng)	1X (~100 ng)	1X (~50 ng)	1X (~60 ng)
Insertti	3X (<i>luxAB</i> ~125 ng, YeO:3 ~25 ng)	3X (~150 ng)	1X (~60 ng)	1X (~60 ng)
10XBuffer T4 DNA ligase with 10 mM ATP (Biolabs Inc, New Eng- land)	1X	1X	1X	1X
T4 DNA Lig- ase (Biolabs Inc, New Eng- land) 400 000 U/ml	200 U	200 U	200 U	200 U

8.12 pMMT1-plasmidin valmistus

pMMT1-plasmidin valmistus aloitettiin eristämällä pUC19-plasmidi *E. coli* DH10B -bakteerikannasta (Taulukko 3) NucleoBond Xtra Midi/Maxi -tuotteella ja pTetlux1-plasmidi *E. coli* DH10B -kannasta (Taulukko 3) NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuotteella (Kuva 3).



Kuva 3. pMMT1-plasmidin valmistusprosessi.

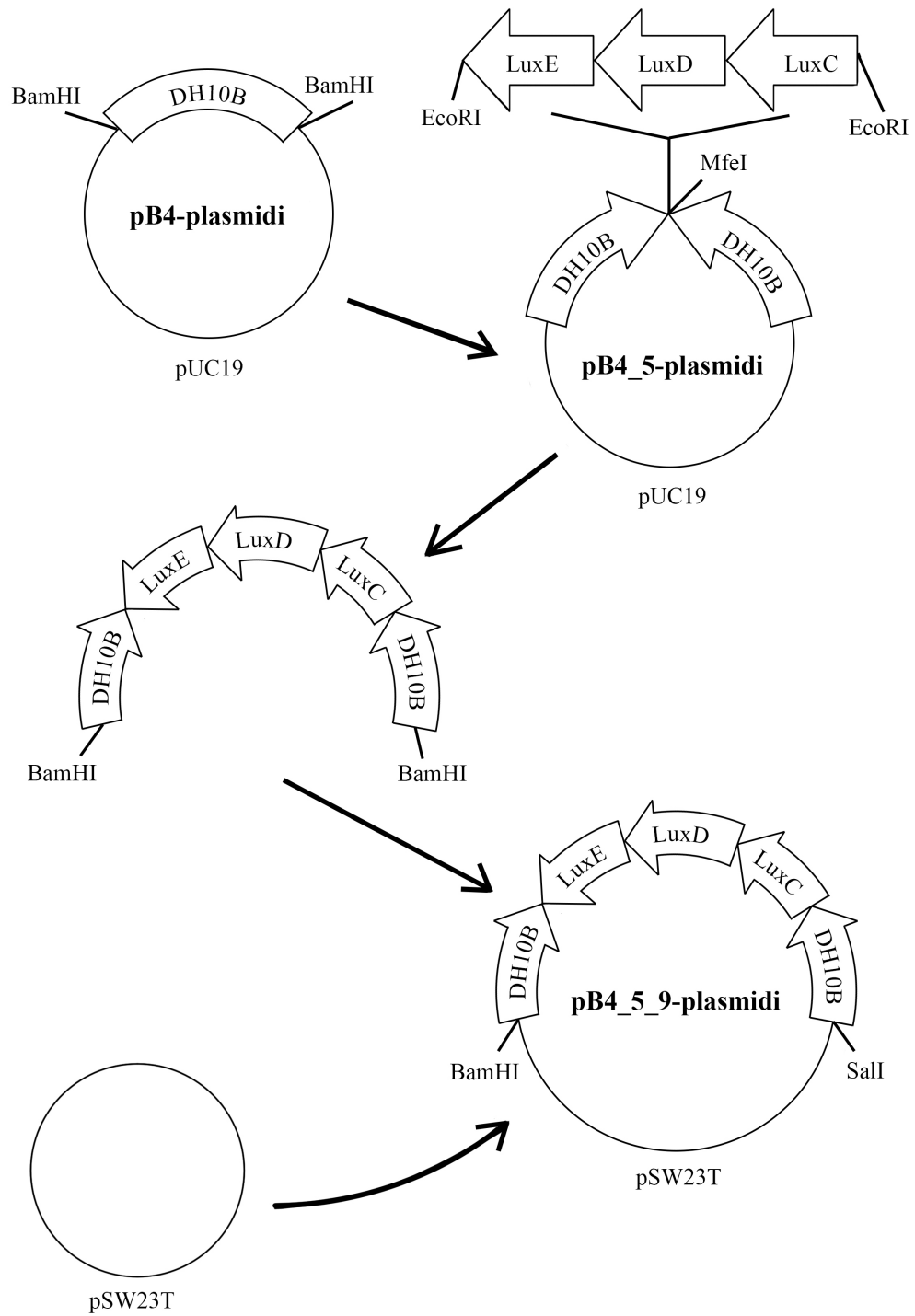
Plasmideille tehtiin koedigestiot entsyymeillä *Bam*HI-HF, *Eco*RI-HF ja *Sal*I-HF (Biolabs Inc., Taulukko 4). Kontrollina käytettiin pTetlux1-CDE-AB-plasmidia (Taulukko 3). pTetlux1-plasmidin DNA:ta monistettiin gradientin PCR:n avulla kuudessa eri lämpötilassa

72 °C, 69,9 °C, 67,7 °C, 64,6 °C, 62,5 °C ja 60,5 °C (Taulukot 6 ja 7). Jatkotutkimuksiin valittiin parhaiten monistuneet näytteet. PCR:ssa käytettiin alukkeita lux2 F ja lux2 R (Taulukko 5) ja ekstensioaika oli 60 sekuntia. pTetlux1-plasmidista monistettiin PCR-tuote, joka sisälsi lusiferaasioperonin *A*- ja *B*-geenit. Seuraavaksi monistettiin genomista *Yersinia enterocolitica* O:3 kannan *ompF*-geenin promoottorifragmenttia gradientilla PCR:lla viidessä lämpötilassa 72 °C, 69,9 °C, 67,7 °C, 64,6 °C ja 61 °C (Taulukot 6 ja 7). Jatkotutkimuksiin valittiin näytteet kuten edellä. Alukkeet olivat pHigh1-FS ja pHigh1-RE ja ekstensioaika oli 15 sekuntia (Taulukko 5). PCR-tuotteet ajettiin 1 % agarosigeelille. Tämän jälkeen digestoitiin pUC19-plasmidista vektorifragmentti *Bam*HI-HF- ja *Sal*I-HF-entsyymeillä ja tehtiin AP-käsittely (FastAP Alkaline Phosphatase 1U/μl) valmistajan ohjeiden mukaisesti. pUC19-fragmentti ajettiin 1.2 % preparatiiviselle agarosigeelille yhdessä pTetlux1- ja gYeO:3 (*ompF*) -PCR-tuotteiden kanssa. DNA-fragmentit leikattiin irti ja ne puhdistettiin NucleoSpin® Gel and PCR Clean up -tuotteella. Tämän jälkeen PCR-tuotteet pTetlux1 ja gYeO:3 (*ompF*) digestoitiin inserteiksi luomalla niihin kohessiiviset päät ligaatiota varten. Digestiot tehtiin pTetlux-tuotteelle *Eco*RI-HF+*Bam*HI-HF-restriktioentsyymiyhdistelmällä ja gYeO:3 (*ompF*) -tuotteelle *Eco*RI-HF+*Sal*I-HF-restriktioentsyymiyhdistelmällä. Molemmat digestiot suoritettiin ja inaktivoitiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Puhdistus tapahtui NucleoSpin® Gel and PCR Clean up -tuotteella. Puhdistuksen jälkeen tehtiin kolmen fragmentin ligaatio T4 DNA-ligaasilla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Reaktiossa käytettiin 50 ng vektoria ja molempia inserttejä 3 x molaarinen ylimäärä (Taulukko 8). Ligaatiota inkuboitiin ja se inaktivoitiin ohjeiden mukaisesti. Kontrollina käytettiin vektoriligaatioseosta, johon ei lisätty inserttejä. Ligaation jälkeen tehtiin elektroporaatio elektrokompetentteihin soluihin #2689 *E. coli* DH10B -bakteerikantaan (Taulukko 3) plasmidituotteella ja pUC19-plasmidilla sekä lisäksi solukontrollilla. Transformaatiopesäkkeistä siirrostettiin LA-puhdasviljelmämaljat antibiootin läsnä ollessa (Amp 100 μg/ml) ja niistä LB-liemikasvatukset antibiootin läsnä ollessa (Amp 100 μg/ml). Liemiviljelmistä tehtiin plasmidien eristys Siri-menetelmällä. Tuotteet ajettiin 1 % agarosigeelille, josta valittiin sopivat plasmidit eristettäväksi. Plasmidit eristettiin puhdasviljelmiltä siirrostetuista liemiviljelmistä NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuotteen avulla. Eristetyille plasmideille tehtiin koedigestio *Eco*RI-HF+*Hind*III -restriktioentsyymiyhdistelmällä (Taulukko 4). Tämän jälkeen valittiin lisäkoedigestioihin plasmidit, joista tehtiin uudet koedigestiot seuraavilla restriktioentsyymiyhdistelmillä: *Bam*HI-HF+*Sal*I-HF, *Pae*I, *Sca*I+*Rru*I (Thermo Scientific, Taulukko 4). Kontrollina käytettiin kaikissa digestioissa aiemmin eristettyä pUC19-plasmidia. Lopuksi valittiin kaksi näytettä sekvensointiin FIMM:iin suunni-

teltujen alukkeiden kanssa (Taulukko 5). Sekvenssien saavuttua nimettiin toinen plasmideista pMMT1:ksi. Plasmidista piirrettiin saapuneen sekvenssin perusteella SnapGene® Viewer 4.1.4 -ohjelman (GSL Biotech LLC, USA) avulla mittasuhteiltaan oikean kokoinen plasmidi.

8.13 Itsemurhaplasmidin valmistus

Ensimmäisessä vaiheessa itsemurhaplasמידeja valmistettiin neljä kappaletta ja ne nimettiin A-, B-, C- ja D-näytteiksi. Vektorin valmistus aloitettiin gDNA-palan siirtämisellä pUC19-vektoriin (Kuva 4).



Kuva 4. pB4_5_9-plasmidin valmistusprosessi.

Ensimmäisenä tehtiin kannan #6557 *E. coli* DH10B pUC19-plasmidille (Taulukko 3) kaksi eri digestiota *Bam*HI-HF ja *Sal*I-HF-restriktioentsyymeillä (Taulukko 4). Digestoidut DNA-fragmentit ajettiin 1.2 % preparatiiviselle agarosigeelille, josta ne leikattiin irti ja

puhdistettiin NucleoSpin® Gel and PCR Clean up -tuotteella. #2689 *E. coli* DH10B gDNA:ta (Taulukko 3) monistettiin gradientin PCR:n avulla neljässä lämpötilassa (Taulukot 6 ja 7) 69,9 °C, 64,6 °C, 62,5 °C ja 60 °C käyttämällä neljää erilaista alukeparia (A = folAfB ja RS00255fB, B = RS10080fB ja HptXfB, C = RS10195fS ja KHGfS, D = RS07420fB, Taulukko 5). Reaktion ekstensioaika oli 45 sekuntia. PCR-tuotteet ajettiin 1 % agarosigeelille, jonka perusteella valittiin parhaiten monistuneet tuotteet puhdistukseen ja digestoitavaksi. Näytteet puhdistettiin kuten edellä kaupallisella tuotteella. Puhdistetuille PCR-tuotteille A, B ja D tehtiin digestiot *Bam*HI-HF-entsyymillä ja C-tuotteelle *Sal*I-HF-entsyymillä (Taulukko 4). Digestoidut insertit puhdistettiin kuten aiemmin, jonka jälkeen ne ajettiin 1 % agarosigeelille yhdessä digestoimattomien näytteiden kanssa. Tämän jälkeen tehtiin ligaatit T4 DNA-ligaasilla seuraavilla vektori- ja insertiyhdistelmillä: pUC19 (*Bam*HI) + A gDH10B (*Bam*HI), pUC19 (*Bam*HI) + B gDH10B (*Bam*HI), pUC19 (*Bam*HI) + D gDH10B (*Bam*HI) ja pUC19 (*Sal*I) + C gDH10B (*Sal*I). Kaikkiin ligaatioihin tuli 100 ng vektoria ja inserttiä 3 x molaarinen ylimäärä (Taulukko 8). Kontrollina käytettiin molempien vektorien ligaatioseoksia, joihin ei pipetoitu inserttiä. Inkubointi ja inaktivointi suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Plasmidit ja taustat elektroporoitiin #2689 *E. coli* DH10B -bakteerisoluihin (Taulukko 3), jonka jälkeen solususpensiot siirrostettiin LAMaljoille antibiootin läsnä ollessa (Amp 100 µg/ml). Transformoiduille pesäkkeille (20 kpl) tehtiin plasmidin eristys NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuotteella. Plasmidit tarkistettiin erilaisten koedigestioiden avulla: A gDH10B pUC19, B gDH10B pUC19 ja D gDH10B pUC19 *Bam*HI- ja *Eco*RI+*Hind*III-entsyymien avulla sekä gDH10B pUC19 *Sal*I ja *Eco*RI+*Hind*III-entsyymien avulla (Taulukko 4). B-tuote (vektori + insertti) nimettiin pB4-plasmidiksi.

Plasmidin rakentamisen toisessa vaiheessa insertoitiin *luxCDE*-geenit plasmidissa olevan gDH10B-geenin keskelle. Kyseinen työvaihe aloitettiin gradientilla PCR:lla, joka tapahtui käänteisesti eli niin sanotusti ”inverse PCR:n” avulla. Alukeparit olivat A = RS00255rM ja folArM, B = HptXrM ja RS10080rM, C = KHGrM ja RS10195rM, D = 2CysrE ja RS07420rE (Taulukko 5). Tuotteita monistettiin kolmessa eri lämpötilassa 69,9 °C, 64,6 °C ja 61 °C. Reaktion ekstensioaika oli 2 min (Taulukot 6 ja 7). B- ja D-alukkeita käytettiin uudelleen monistuksessa lämpötiloissa 60 °C ja 61 °C jotta saatiin lisää tuotetta. Gradientti PCR suoritettiin samalla tavalla kuin edellä. Seuraavaksi eristettiin #5610 *E. coli* -kannasta pTetlux1-CDE-AB-plasmidi (Taulukko 3) NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuotteella ja digestoititiin siitä *luxCDE*-insertti *Eco*RI-HF-entsyymillä valmistajan ohjeiden mu-

kaisesti (Taulukko 4). PCR-tuotteet eli vektorit ja insertti puhdistettiin 1.2 % preparatiiviselta geeliltä NucleoSpin® Gel and PCR Clean up -tuotteen avulla kuten edellä. Vektorit digestoitiin kahdella eri restriktioentsyymillä, vektorit A, B ja C *MfeI*- (Thermo Scientific) ja D *EcoRI*-HF-entsyymillä (Taulukko 4). Vektoreille tehtiin digestion jälkeen AP-käsittely (FastAP Alkaline Phosphatase 1U/μl) ja inaktivointi valmistajan ohjeiden mukaisesti (Taulukko 4). Puhdistukseen käytettiin NucleoSpin® Gel and PCR Clean up -tuotetta kuten aiemmin. Vektorit liitettiin *luxCDE*-inserttiin T4 DNA-ligaasin avulla. Reaktiossa käytettiin noin 1:1 suhdetta, jossa vektoria oli 50 ng ja inserttiä 60 ng (Taulukko 8). Kontrolleina eli taustana käytettiin jokaisen neljän eri vektorin ligaatioseosta, joihin ei pipetoitu inserttiä ja myös insertin sisältävää reaktioseosta, johon ei lisätty vektoria. Inkubointi ja inaktivointi suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Muodostuneet plasmidit elektroporoitiin #2689 *E. coli* DH10B -bakteerisoluihin (Taulukko 3). Mahdolliset transformantit seulottiin Siri-menetelmän avulla, jonka jälkeen tehtiin plasmidin eristys NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuotteella. Plasmidien rakenne varmistettiin koedigestioiden avulla. Restriktioentsyymeinä käytettiin *EcoRI*+*HindIII*-yhdistelmää (Thermo Scientific) ja *BamHI*-HF- sekä *SalI*-HF-entsyymejä (Taulukko 4). pB4-plasmidista peräisin oleva tuote nimettiin pB4_5-plasmidiksi.

Kolmas vaihe eli insertin (gDH10B + *luxCDE*) siirto pSW23T itsemurhavektoriin aloitettiin pSW23T-plasmidin eristyksellä kantakokoelman #5038 *E. coli* BW19610 -bakteerista (Taulukko 3). Eristys tehtiin NucleoBond Xtra Midi/Maxi -tuotteella. Plasmidin rakenne tarkistettiin *BamHI*-HF-, *SalI*-HF-entsyymeillä ja *EcoRI*+*MfeI* (Thermo Scientific) -entsyymiyhdistelmällä (Taulukko 4). Tämän jälkeen pSW23T-plasmidi digestoitiin kahdella eri reaktiolla: *BamHI*-HF ja *SalI*-HF -restriktioentsyymeillä kahdeksi erilliseksi vektoriksi ja niille tehtiin AP-käsittely (FastAP Alkaline Phosphatase 1U/μl, Taulukko 4). A2/11- ja B4/5-plasmideista irroitettiin insertit (gDH10B + *luxCDE*) *BamHI*-HF-entsyymillä avulla. C7/9- ja C7/11-insertit digestoitiin *SalI*-HF-entsyymiä käyttäen (Taulukko 4). Vektorit ja insertit inaktivoitiin valmistajan ohjeiden mukaisesti ja ne ajettiin 1.2 % preparatiiviseen geeliin puhdistusta varten. DNA-fragmentit leikattiin talteen ja ne puhdistettiin kaupallisella NucleoSpin® Gel and PCR Clean up -tuotteella kuten aiemmin. Valmiit vektorit ja insertit liitettiin yhteen T4 DNA-ligaasin avulla (Taulukko 8). Ligaatioissa *BamHI*-HF-restriktioentsyymillä katkaistu pSW23T-vektori liitettiin kahdessa eri reaktiossa sekä A2/11- että B4/5-inserttiin, *SalI*-HF-restriktioentsyymillä katkaistu pSW23T-vektori liitettiin myös kahdessa eri reaktiossa sekä C7/9- että C7/11-inserttiin. Kaikki neljä plasmidia elektropo-

roitiin kahteen eri bakteerikantaan; #1434 *E. coli* Sy327λpir ja #5005 *E. coli* ω7249 (Taulukko 3). Elektroporoituja soluja kasvatettiin LA-maljoilla kloramfenikolin läsnä ollessa (Clm 20 µg/ml, *E. coli* ω7249 lisäksi DAP 0,3 mM) +37 °C, yön yli. Transformantit tarkistettiin Siri-menetelmän avulla ja valituista näytteistä tehtiin plasmidin eristys NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) -tuotteella. Plasmidien rakennetta tarkasteltiin vielä koedigestioiden avulla käyttämällä *EcoRI*-HF- ja *Bam*HI-HF-entsyymejä sekä lopuksi tupladigestiolla *MfeI*+*XbaI* (Thermo Scientific, Taulukko 4). pB4_5-plasmidista peräisin oleva insertti, joka liitettiin itsemurhaplasmidin vektoriin, nimettiin pB4_5_9-plasmidiksi.

Lopuksi plasmidien tarkistusten jälkeen *E. coli* -luovuttajakannat ω7249 B4/5/5, B4/5/9 ja B4/5/12 konjugoitiin #6152 *E. coli* DH5alpha -vastaanottajakannan kanssa kuten aiemmin konjugaatiokohdassa 8.10 on mainittu (Taulukko 3). Tämän jälkeen luovuttajalta vastaanottajalle siirtyneen DNA:n rakenne varmistettiin pesäke-PCR:n avulla (Taulukot 6 ja 7) Lux-FE- ja luxc-r-alukkeilla (Taulukko 5) konjugaatioiden bakteeripesäkkeistä. Ekstensioaika oli 2 min. Rakenteen varmistuttua bakteeripesäkkeestä tehtiin LB-liemikasvatus, jota nuorennettiin 1:50 kolme kertaa kuten bakteerikasvatuskohdasta 8.1 käy ilmi. Liemikasvatuksista tehtiin 10⁻⁶-laimennos, joista viljeltiin LA-maljalle solususpensiota 150 µl/näyte. Bakteereja kasvatettiin +37 °C 2 vrk, jonka jälkeen pesäkkeet seulottiin LA- ja LA-kloramfenikoli (20 µg/ml) -maljojen avulla. Kloramfenikolimaljoilla kasvamattomat näytteet tarkistettiin uudestaan kuten edellä pesäke-PCR:lla (Taulukot 6 ja 7) Lux-FE- ja luxc-r-alukkeiden avulla (Taulukko 5). Valikoiduista näytteistä tehtiin uusi pesäke-PCR (Taulukot 6 ja 7) seitsemällä eri alukeparilla: 1 = RS10080-F2 ja luxE-F, 2 = RS10080fB ja luxE-F, 3 = luxC-R ja HptXfB, 4 = luxC-R ja HptX-F2, 5 = luxC-R2 ja HptXfB, 6 = luxC-R2 ja HptX-F2, 7 = luxC-R ja luxC-F2 (Taulukko 5). Merodiploidin rakenteen varmistuttua bakteeripesäkkeistä valmistettiin elektrokompetentteja soluja aiemman ohjeen mukaisesti valontuoton testaamista varten pMMT1-plasmidilla. Toisen ja kolmannen vaiheen plasmidit lähetettiin sekvensoitavaksi FIMM:iin. Sekvenssien perusteella piirrettiin mittasuhteiltaan oikean kokoiset plasmidit SnapGene® Viewer 4.1.4 -ohjelman (GSL Biotech LLC, USA) avulla.

8.14 Valontuoton testaus

Elektroporaatio tehtiin aiemman ohjeen mukaan kolmeen valmistettuun meridiploidikantaan B4/5/9 a3, B4/5/9 a5 ja B4/5/9 a6 *E. coli* DH5alphaan pMMT1-plasmidilla (25 ng). Transformaatiomaljoja (LA) kasvatettiin antibioottien (Amp 100 µg/ml, Clm 20 µg/ml) läsnä ollessa +37 °C, yön yli. Jokaisen kannan maljalta siirrostettiin 8 puhdasviljelmää, joita inkuboitin +37 °C, 30 min ja tämän jälkeen noin 3 vrk huoneenlämmössä. Kasvaneista puhdasviljelmistä valittiin viisi, joilta siirrostettiin erillispesäkkeet LB-liemeen 5 ml:iin (Amp 100 µg/ml, Clm 20 µg/ml) Falcon®-putkeen (15 ml) ja annettiin kasvaa +37 °C, yön yli. Negatiivista #6152 *E. coli* DH5alpha -kontrollia kasvatettiin ilman antibioottia +37 °C, yön yli (Taulukko 3). Positiivisia *Yersinia enterocolitica* -kontrolleja #6141 ja #5455 inkuboitin sopivan antibiootin (Km 50 µg/ml) läsnä ollessa yön yli, RT (Taulukko 3). Valontuottoa ja absorbansseja (OD₄₅₀) mitattiin luminesenssin avulla neljällä rinnakkaisella näytteellä (Liite 7) kirkkaalla 96-kuoppalevyllä Hidex Sense Microplate Reader -laitteella (Hidex Oy, Liite 2). Näytteiden kasvusta johtuvien erojen tasaaminen tapahtui vähentämällä luminesenssin blank-arvo (niin kutsuttu nolla-arvo) luminesenssiarvoista ja absorbanssin blank-arvo absorbanssiarvoista, jonka jälkeen luminesenssiarvo jaettiin absorbanssiarvolla. Laskukaava: näytteen luminesenssiarvo – blank-arvo ÷ näytteen absorbanssiarvo – blank-arvo = näytteiden suhteellinen valoyksikkö (RLU).

8.15 Valontuoton standardisointi

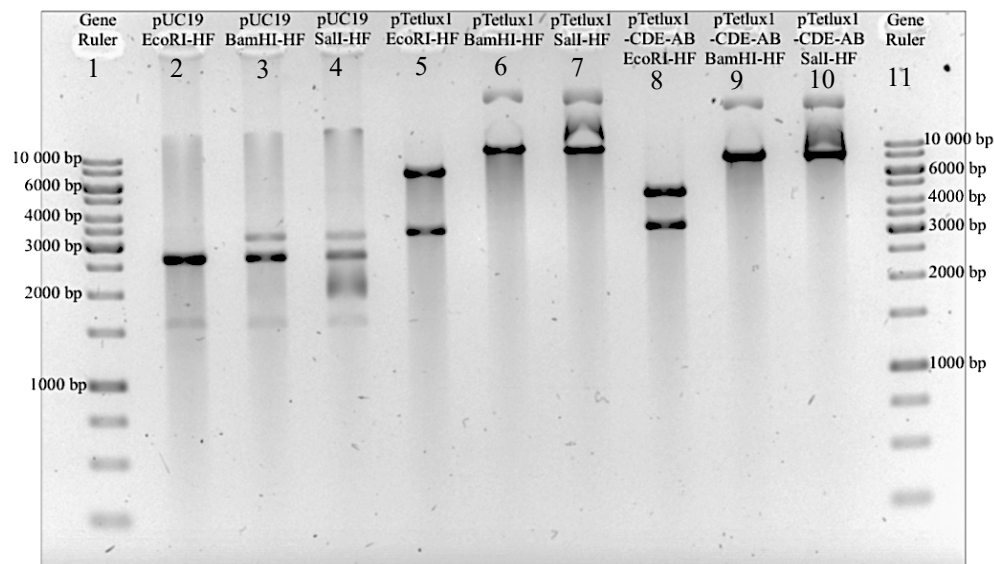
Valontuoton toimivuutta testattiin uudestaan pMMT1-plasmidin rakenteen varmistamiseksi. #5958 *E. coli* Sy327/pEfB6 pSW23T ja #5963 *E. coli* Sy327/pEfB7-a pKNG101 -bakteerisolusta (Taulukko 3) valmistettiin elektrokompotentteja soluja joihin elektroporoitiin pMMT1-plasmidia (25 ng) aiemman ohjeen mukaisesti. Näytteet viljeltiin maljoille sopivien antibioottien läsnä ollessa (#5958 soluihin elektroporoidut Amp 100 µg/ml, Clm 20 µg/ml, #5963 soluihin elektroporoidut Amp 100 µg/ml, Strept 50 µg/ml) ja inkuboitin +37 °C, yön yli. Elektroporoiduista näytteistä valmistettiin puhdasviljelmät, joilta siirrostettiin erillispesäkkeet LB-liemeen (5 ml) edellä mainittujen antibioottien läsnä ollessa. Negatiivinen kontrollikanta #1434 *E. coli* SY327λpir (Taulukko 3) kasvatettiin ilman antibioottia. Näytteitä kasvatettiin +37 °C, yön yli. Lisäksi kasvatettiin positiiviset #6141 ja

#5455 *Yersinia* -kontrollit (Km 50 µg/ml, RT) kuten edellä valontuoton testauksessa aiemmin (Taulukko 3). Solususpensioiden absorbanssi-arvot tasattiin laimennoksilla (*E. coli* 1:50, *Y. enterocolitica* 1:25), jonka jälkeen niitä kasvatettiin vielä noin 6 h. Valontuottoa ja absorbanseja (OD₆₀₀) mitattiin kirkaspohjaisella 96-kuoppalevyllä neljällä rinnakkaisella näytteellä kuten edellä (Liite 8). Tulokset saatiin samalla laskukaavalla kuten aiemmin valon tuoton testauksessa.

9 TULOKSET

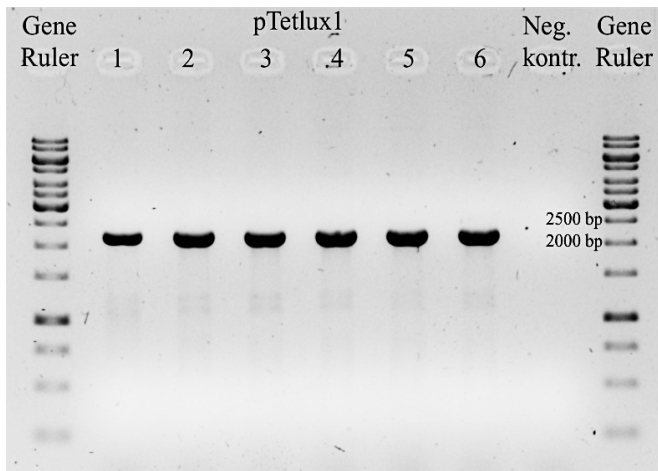
9.1 pMMT1-plasmidi

pMMT1-plasmidia varten digestoidut DNA-fragmentit valittiin koedigestioiden avulla 1 % agarosigeeliltä fragmenttien kokoa havainnoimalla. *EcoRI*-HF digestoi pUC19-vektorin ja katkaisee plasmidin yhdestä kohdasta. pTetlux1- ja pTetlux1-CDE-AB-plasmidit katkeavat kahdesta kohdasta. *Bam*HI-HF- ja *Sal*I-HF-digestiot jäävät partiaalisiksi (Kuva 5).



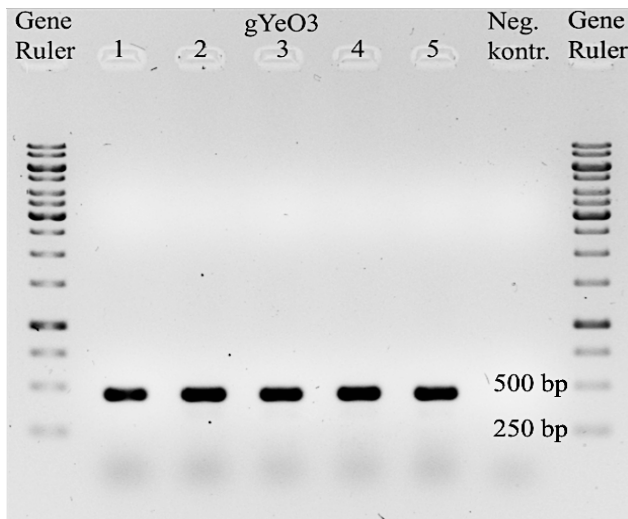
Kuva 5. Eristettyjen plasmidien pUC19 ja pTetlux1 koedigestiot agarosigeelillä. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pUC19: Digestoitu pUC19-plasmidi (Kaivot 2, 3 ja 4). pTetlux1: Digestoitu pTetlux1-plasmidi (Kaivot 5, 6 ja 7). pTetlux-CDE-AB: Digestoitu pTetlux1-CDE-AB-plasmidi (Kaivot 8, 9 ja 10). Digestioentsyymit: *Bam*HI-HF, *Eco*RI-HF, *Sal*I-HF.

PCR:lla monistettiin pTetlux1-plasmidista lux2 F- ja lux2 R-alukkeiden avulla *luxAB*-geenit. Tuotteen odotettu koko oli noin 2000 bp ja se monistui jokaisessa lämpötilassa (Kuva 6).



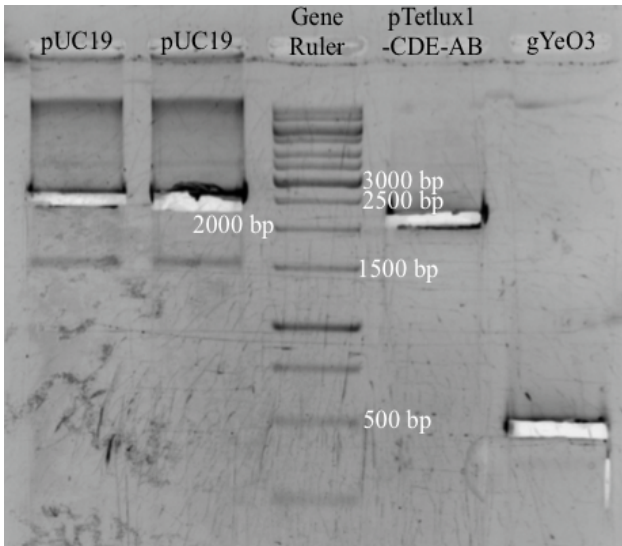
Kuva 6. Agarosigeelikuva PCR:lla monistetuista *luxAB*-fragmenteista. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pTetlux1: *luxAB*-PCR-tuotteet. Lämpötilat: 1. 72 °C, 2. 69.9 °C, 3. 67.7 °C, 4. 64,6 °C, 5. 62,5 °C, 6. 60.5 °C. Negatiivinen kontrolli, lämpötila: 62.5 °C.

YeO:3-gDNA:sta monistettiin gradientilla PCR:lla pHigh1-FS- ja pHigh1-RE-alukkeiden avulla *ompF*-promootorin sisältämä fragmentti (YeO:3) viidessä eri lämpötilassa. DNA-palat ovat kooltaan alle 500 bp (Kuva 7).



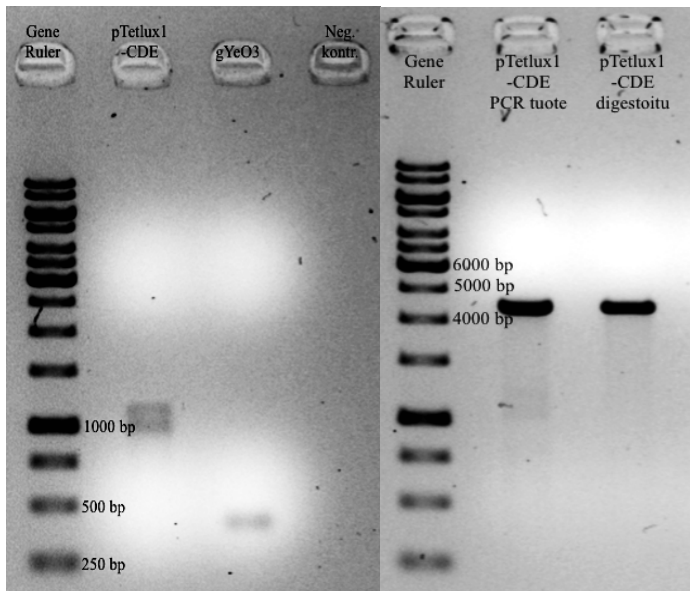
Kuva 7. PCR:lla monistetut YeO:3-fragmentit (*ompF*-promootori) agarosigeelillä. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). gYeO3: YeO:3-tuotteet. Lämpötilat: 1. 72 °C, 2. 69.9 °C, 3. 67.7 °C, 4. 64.6 °C, 5. 61 °C. Negatiivinen kontrolli, lämpötila: 61 °C.

Preparatiiviselta geeliltä voitiin havainnoida pUC19-plasmidista tuplana digestoidun ja alkaalisella fosfataasilla käsiteltyjen (*Bam*HI-HF, *Sal*I-HF) fragmenttien (vektori) olevan yli 2000 bp. Lisäksi nähtiin toistamiseen, että pTetlux1-CDE-AB-plasmidista (Taulukko 3) monistettu *luxAB*-fragmentti oli noin 2000 bp ja YeO:3 gDNA:sta monistettu (Taulukko 3) YeO:3-fragmentti noin 500 bp (Kuva 8).



Kuva 8. Preparatiivinen geelikuva digestoiduista pUC19-vektorista, *luxAB*-insertistä ja gYeO:3-insertistä. pUC19: digestoidut (*Bam*HI-HF, *Sal*I-HF) pUC19-fragmentit (Kaivot 1,2). GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pTetlux1-CDE-AB: *luxAB*-insertti. gYeO3: *ompF*-promootorin sisältävä YeO:3-fragmentti.

Inserttien tupladigestiot, YeO:3-fragmentille (*ompF*-promoottori) *Eco*RI-HF- ja *Sal*I-HF-yhdistelmällä ja *luxAB*-pala (pTetlux1-CDE) digestoitiiin toistamiseen *Eco*RI-HF- ja *Bam*HI-HF-entsyymeillä, sillä fragmentti näytti hajoavan kahteen osaan. Toistettu digestio tehtiin ilman inaktivaatiota (Kuva 9).



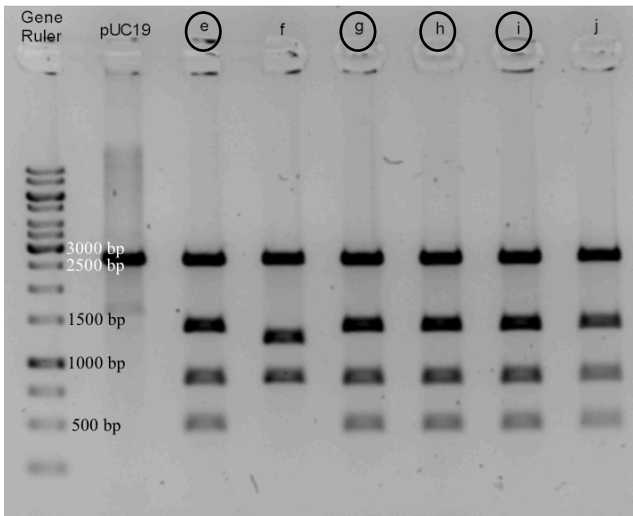
Kuva 9. Inserttien YeO:3 (*ompF*-promootori) ja pTetlux1-CDE koedigestiot agarosigeelillä (vasemmalla ensimmäinen digestio, oikealla toistettu digestio). GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pTetlux1-CDE-AB: *luxAB*-insertti. gYeO3: YeO:3-insertti (*ompF*-promootori).

Ligaation (pUC19-vektori, YeO:3-insertti, *luxAB*-insertti) ja transformaation jälkeen eristetyt plasmidit (Siri-menetelmä) agarosigeelillä. Koedigestioihin valittiin näytteet e, f, g, h, i, j (Kuva 10).



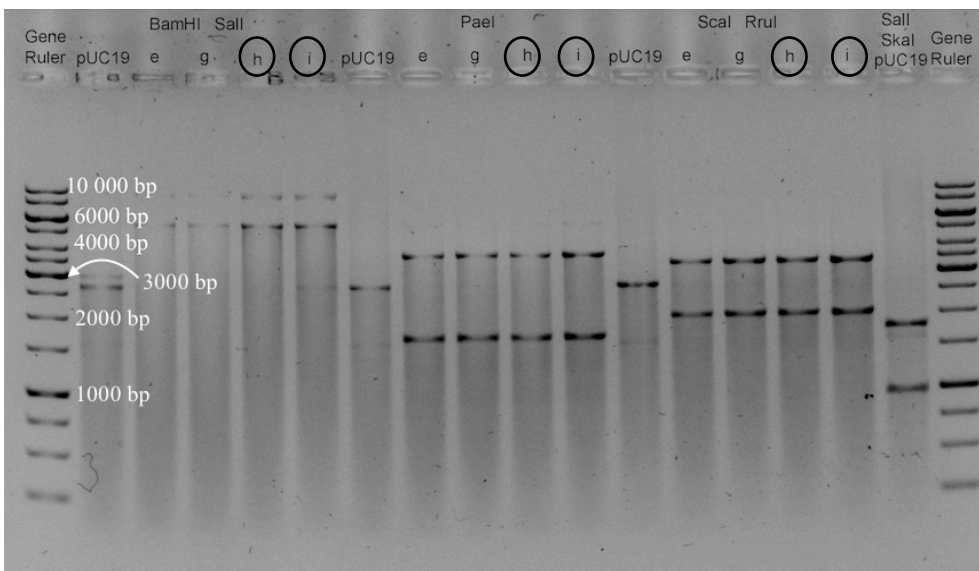
Kuva 10. Agarosigeelikuva transformaation jälkeen eristetyistä plasmideista. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pUC19: positiivinen kontrolliplasmidi. Näytteet a-y: eristetyt plasmidit.

Eristettyjen plasmidien tupladigestiot (*EcoRI*-HF+*HindIII*). Valittiin neljä DNA-juovaa muodostavat näytteet e, g, h ja i (Kuva 11).



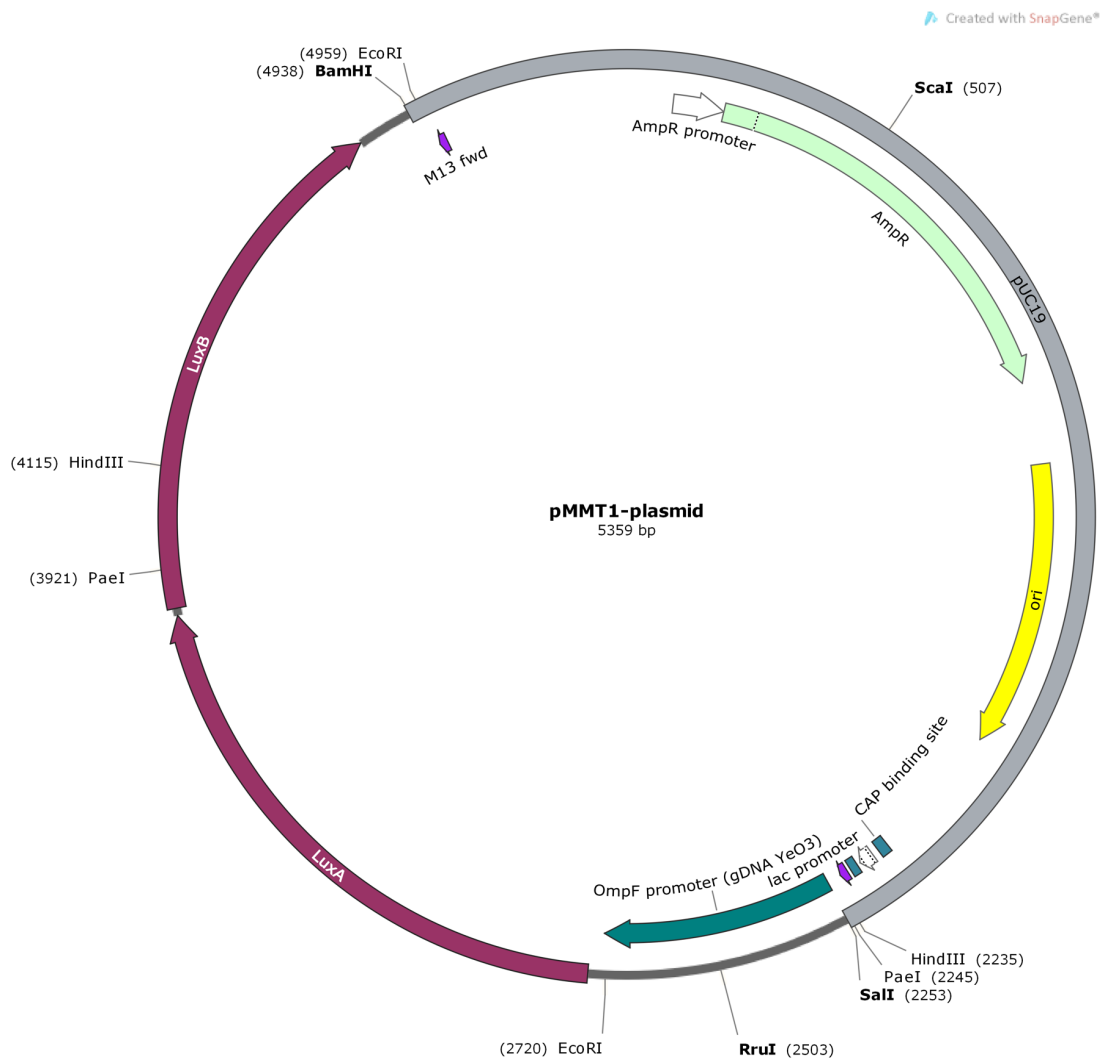
Kuva 11. Agaroosigeelikuva plasmidien e, f, g, h, i ja j koedigestioista. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pUC19: kontrolliplasmidi. Näytteet e-j: digestoidut plasmidit (*EcoRI*-HF+*HindIII*).

Plasmideille tehtiin kolme digestiota (*Bam*HI+*Sal*I, *Pae*I, *Sca*I+*Rru*I). Kaksi näytteistä, h ja i, valittiin sekvensointiin FIMM:iin (Kuva 12).



Kuva 12. Agaroosigeelikuva plasmidien e, g, h ja i koedigestioista. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pUC19: kokonainen kontrolliplasmidi ja digestoitu *Sal*I-HF+*Sca*I. Näytteet e-i: digestoidut plasmidit (*Bam*HI-HF+*Sal*I-HF, *Pae*I ja *Sca*I+*Rru*I).

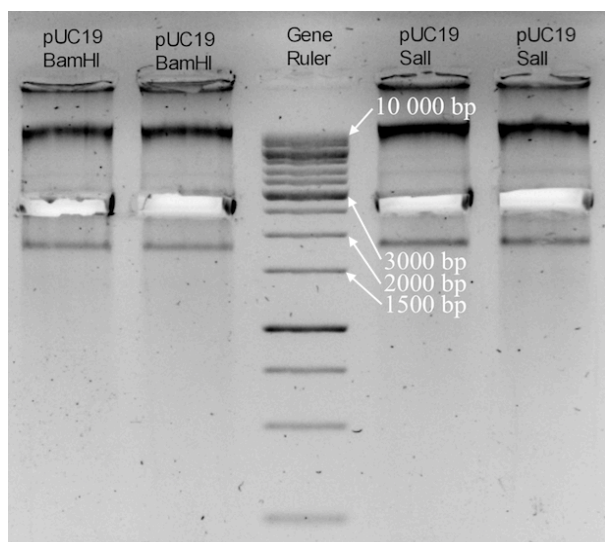
Saapuneen Fasta-tiedoston (Liite 3) perusteella näyte i nimettiin pMMT1-plasmidiksi. DNA-sekvenssin avulla piirrettiin SnapGene® Viewer 4.1.4 -ohjelmalla (GSL Biotech LLC, USA) mittasuhteiltaan oikean kokoinen plasmidi (Kuva 13).



Kuva 13. pMMT1-plasmidi piirretty sekvensointidatasta SnapGene® Viewer 4.1.4 -ohjelman avulla.

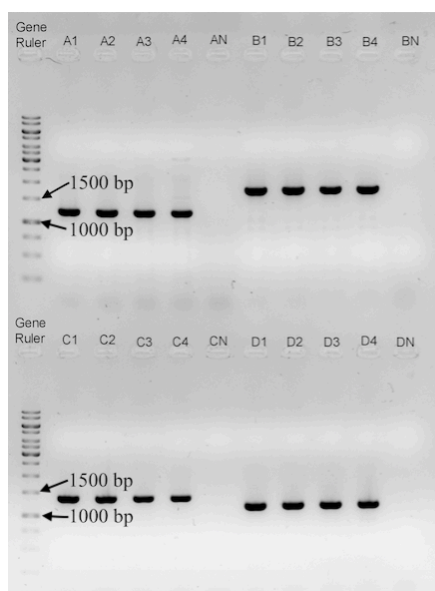
9.2 Itsemurhavektori, genomisen palan siirto pUC19-plasmidiin

Aiemmin eristetystä pUC19-plasmidista digestoitiiin kaksi vektorifragmenttia erikseen, käyttämällä *Bam*HI-HF- ja *Sal*I-HF-entsyymejä ja alkaalista fosfataasia. Preparatiiviselta 1.2 % geeliltä leikattiin talteen noin 2.7 kb kokoiset DNA-fragmentit (Kuva 14).



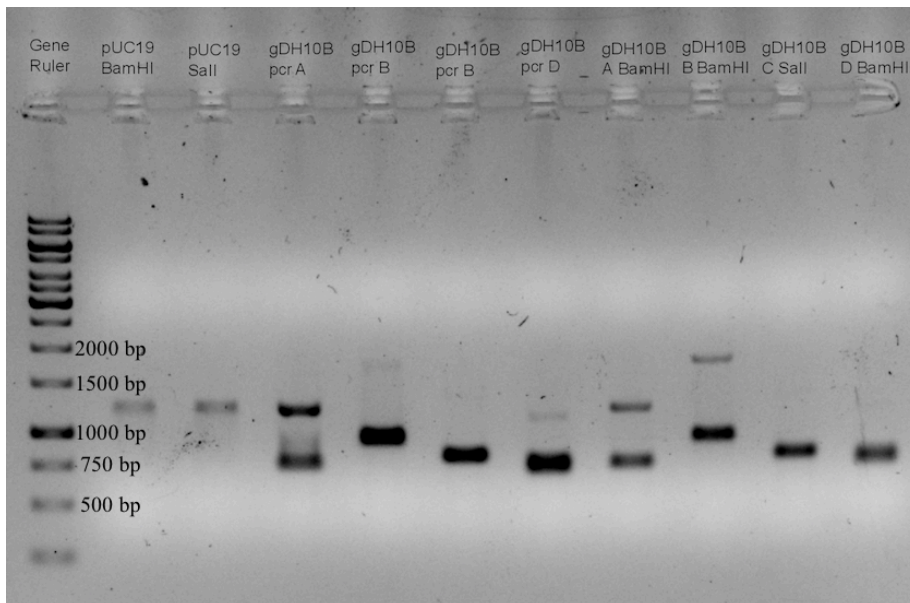
Kuva 14. Preparatiivinen geelikuva digestoidusta pUC19-vektorista *Bam*HI-HF- sekä *Sal*I-HF-entsyymeillä. pUC19 *Bam*HI: digestoitu (*Bam*HI-HF) pUC19-fragmentti. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pUC19 *Sal*I: digestoitu (*Sal*I-HF) pUC19-fragmentti.

DH10B gDNA-insertit monistettiin PCR:n avulla neljässä eri lämpötilassa (1. 69.9 °C, 2. 64.6, °C 3. 62.5 °C, 4. 60 °C), neljällä eri alukeparilla. Puhdistettavaksi valittiin näytteet A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 ja D2 (Kuva 15).



Kuva 15. Agaroseigeelikuva PCR:lla monistetuista gDH10B-fragmenteista. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). A1-A4: folAfB- ja RS00255fB-alukkeilla monistetut gDH10B-fragmentit. B1-B4: RS10080fB- ja HptXfB-alukkeilla monistetut gDH10B-fragmentit. C1-C4: RS10195fS- ja KHGfS-alukkeilla monistetut gDH10B-fragmentit. D1-D4: RS07420fB- ja 2CysfB-alukkeilla monistetut gDH10B-fragmentit. AN, BN, CN, DN: negatiiviset kontrollit.

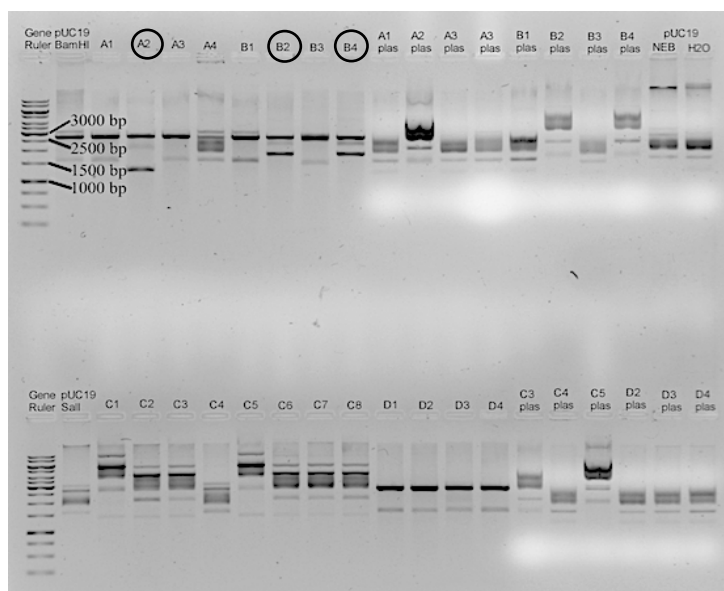
Puhdistuksen jälkeen A-, B- ja D-näytteet digestoitiin *Bam*HI-HF-entsyymillä ja C-näyte *Sal*I-HF-entsyymillä. gDH10B A- ja B-näyte näytti denaturoituneen puhdistuksen aikana. Siitä huolimatta tehtiin ligaatio myös näistä näytteistä (Kuva 16).



Kuva 16. gDH10B-fragmenttien koedigestiot agarosigeelillä. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pUC19: kontrolliplasmidi. A: digestoitu A gDH10B-fragmentti (*Bam*HI-HF). B: digestoitu B gDH10B-fragmentti (*Bam*HI-HF). C: digestoitu C gDH10B-fragmentti (*Sal*I-HF). D: digestoitu D gDH10B-fragmentti (*Bam*HI-HF).

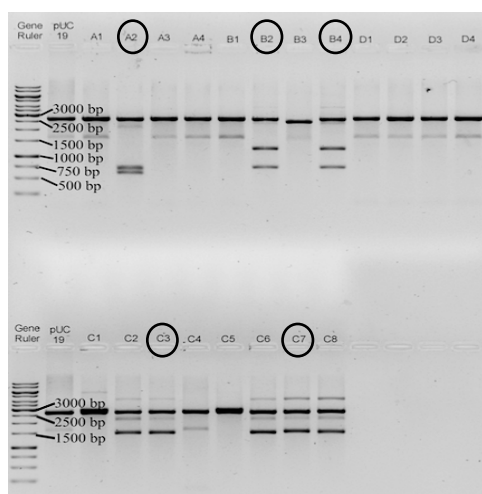
Ligoidut plasmidit (pUC19+gDH10B) A, B, C ja D elektroporoitiin *E. coli* DH10B -soluihin. Transformoiduista näytteistä, A, B ja D valittiin jokaisesta neljä pesäkettä plasmidin eristykseen, näytteestä C valittiin kahdeksan pesäkettä. Eristetyille plasmideille tehtiin koedigestioita niiden rakenteiden varmentamiseksi.

Digestiossa *Bam*HI-HF- ja *Sal*I-HF-entsyymeillä A-, B- ja D-näytteet digestoituvat hyvin *Bam*HI:lla, mutta C-näytteiden digestoituminen *Sal*I-HF:lla jäi osittaiseksi. Näytteet A2, B2 ja B4 olivat digestoituneet oikean kokoisiksi (Kuva 17).



Kuva 17. Agaroosigeelikuva plasmidien A, B, C ja D koedigestioista. Ympyröidyt näytteet A2, B2 ja B4 digestoituivat oikean kokoisiksi. GeneRuler: Molekyylikostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pUC19: positiivinen kontrolli. A1-A4: digestoitu plasmidi (*Bam*HI-HF). B1-B4: digestoitu plasmidi (*Bam*HI-HF) C1-C8: digestoitu plasmidi (*Sall*I-HF). D1-D4: digestoitu plasmidi (*Bam*HI-HF). A1-A3 plas, B1-B4 plas, C3-C5 plas, D2-D4 plas: kokonaiset plasmidit. pUC19 NEB ja H₂O: bufferin ja veden negatiiviset kontrollit.

Koedigestiossa *Eco*RI-HF+*Hind*III A2, B2, B4, C2, C3, C6, C7 ja C8 digestoituivat oikean kokoisiksi fragmenteiksi. Geelikuvan perusteella valittiin näytteet A2, B2, B4, C3 ja C7 (Kuva 18).



Kuva 18. Koedigestiokuva agaroosigeelistä plasmidit A, B, C ja D. GeneRuler: Molekyylikostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pUC19: positiivinen kontrolli. A1-A4: digestoitu plasmidi. B1-B4: digestoitu plasmidi. C1-C8: digestoitu plasmidi. D1-D4: digestoitu plasmidi. Digestioentsyymit: *Eco*RI-HF+*Hind*III.

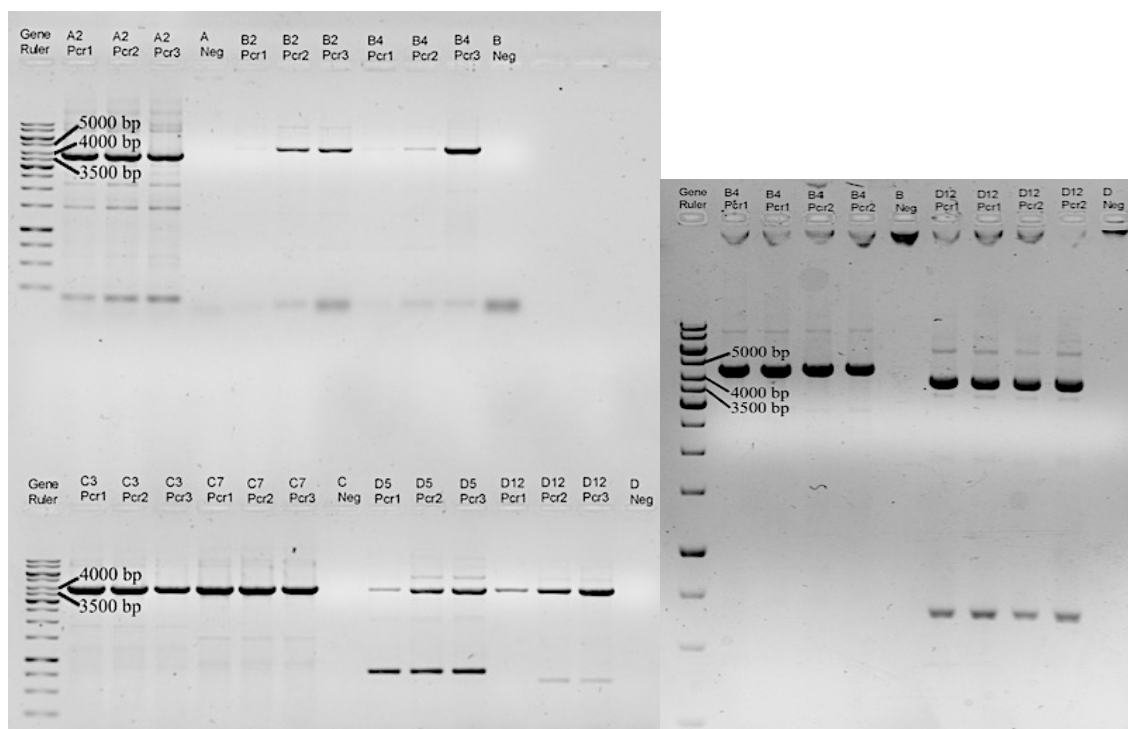
D-näytteiden transformoiduista pesäkkeistä seulottiin lisää Siri-menetelmällä mahdollisia plasmidin sisältäviä pesäkkeitä. Valittiin kolme näytettä D5, D8 ja D12 plasmidin eristykseen, joista tehtiin koedigestio *Bam*HI-HF:lla ja tupladigestio *Eco*RI-HF+*Hind*III-yhdistelmällä. Lisäksi testattiin uudelleen C-näytteiden digestoitumista *Sal*I-HF-entsyymillä. Agaroosigeeliltä valittiin näytteet D5, D12 ja varmistettiin näytteiden C3 sekä C7 valinta (Kuva 19).



Kuva 19. Agaroosigeelikuva plasmidien D5, D8, D12, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 ja C8 koedigestioista. GeneRuler: Molekyylilikostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pUC19: positiivinen kontrolli. D5, D8, D12: digestoitunut plasmidi (*Bam*HI-HF ja *Eco*RI-HF+*Hind*III) C1-C8: digestoitunut plasmidi (*Sal*I-HF).

9.3 Itsemurhavektori, *luxCDE*-palan insertointi genomisen palan keskelle

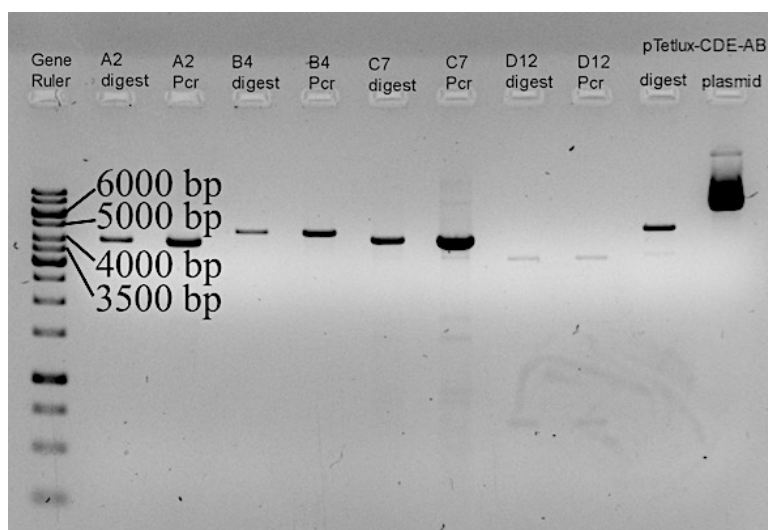
Koedigestiolla valituista näytteistä A2, B2, B4, C3, C7, D5 ja D12 tehtiin käänteinen PCR monistamalla plasmideja neljällä eri alukeparilla kolmessa eri lämpötilassa (Pcr 1. 69.9 °C, Pcr 2. 64.6 °C, Pcr 3. 61 °C). Alemmat PCR-lämpötilat toimivat paremmin. B4- ja D12-näytteistä tehtiin uusi PCR kahdessa alimmassa lämpötilassa, jotta saatiin enemmän DNA:ta. Valittiin näytteet A2, B4, C7 ja D12 vektorifragmenteiksi (Kuva 20).



Kuva 20. Agaroosigeelikuvat käänteisellä PCR:lla monistetuista plasmideista A2, B2, B4, C3, C7, D5 ja D12. Vasemmalla ensimmäinen PCR, oikealla uusinta PCR alemmilla lämpötiloilla. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). A2: folArM- ja RS00255rM-alukkeilla monistetut DNA-fragmentit. B2, B4: RS10080rM- ja HptXrM-alukkeilla monistetut DNA-fragmentit. C3, C7: RS10195rM- ja KHGrM-alukkeilla monistetut DNA-fragmentit. D5, D12: RS07420rE- ja 2CysrE-alukkeilla monistetut DNA-fragmentit. Oikea kuva: Pcr 1. 69.9 °C, Pcr 2. 64.6 °C, Pcr 3. 61 °C. A Neg, B Neg, C Neg, D Neg: negatiiviset kontrollit. Vasen kuva: Pcr 1. 64.6 °C, Pcr 2. 61 °C. B Neg, D Neg: negatiiviset kontrollit.

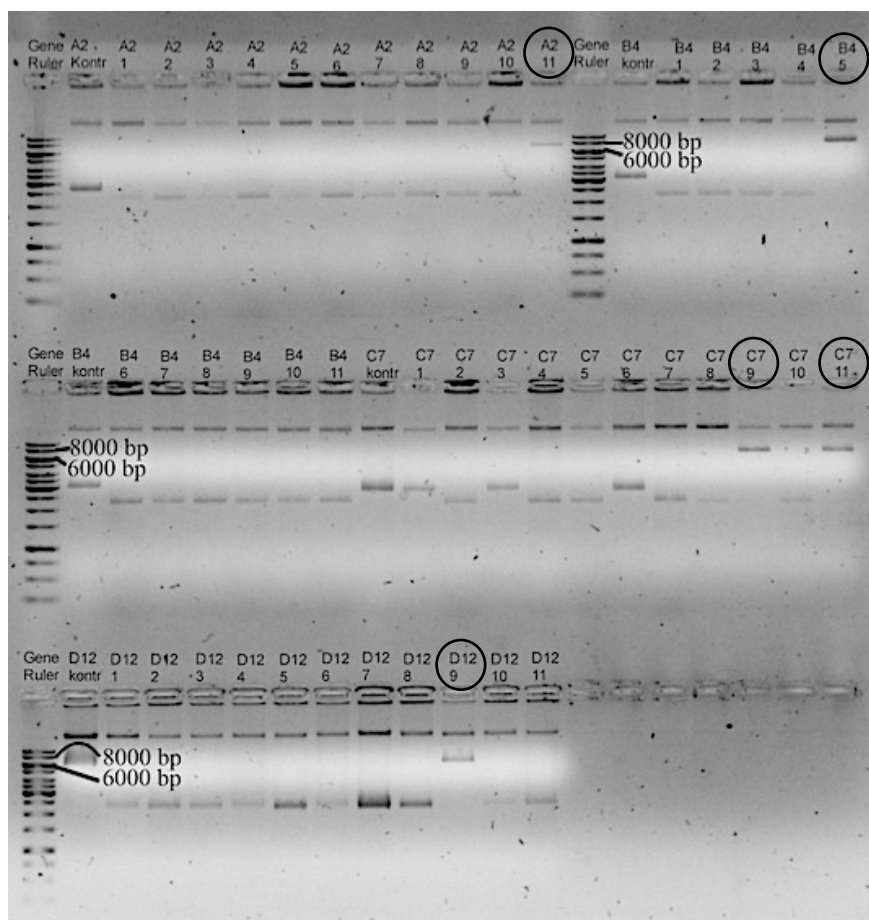
luxCDE-insertti digestoitiiin plasmidista (pTetlux1-CDE-AB) *EcoRI*-HF-entsyymillä. Geeliltä leikattiin talteen DNA-fragmentit, jotka olivat kooltaan noin 3500-4000 bp. Talteen leikattiin myös PCR-tuotteet A2, B4 ja D12 noin 3500-4000 bp.

A2-, B4- ja C7-vektorit digestoitiiin *MfeI*-entsyymillä ja D12-vektori *EcoRI*-HF-entsyymillä. Vektorifragmenttien rakenne varmistettiin agaroosigeeliltä ennen ligaatiota. D12-näytteen DNA-konsentraatio oli alhainen (Kuva 21).



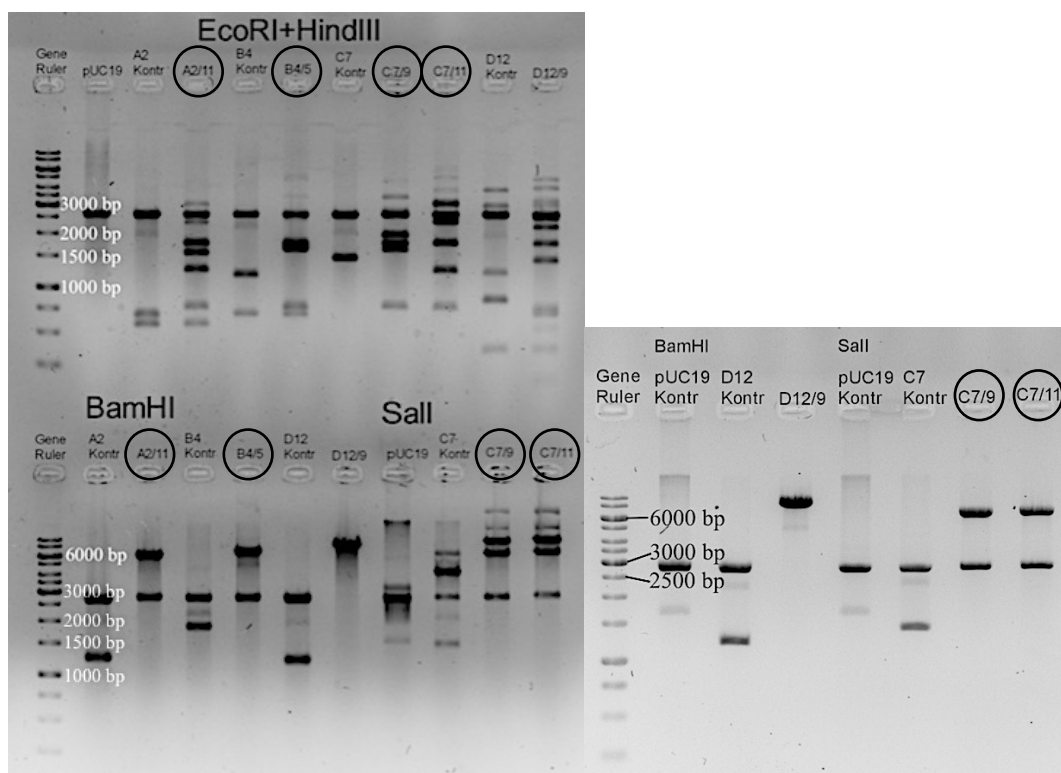
Kuva 21. Agaroosigeelikuva plasmidien A2, B4, C7 ja D12 koedigestioista. GeneRuler: Molekyylilikostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). A2 digest: digestoitu A2-fragmentti (*MfeI*). A2 Pcr: digestoimaton PCR-tuote. B4 digest: digestoitu B4-fragmentti (*MfeI*). B4 Pcr: digestoimaton PCR-tuote. C7 digest: digestoitu C7-fragmentti (*MfeI*). C7 Pcr: digestoimaton PCR-tuote. D12 digest: digestoitu D12-fragmentti (*EcoRI*-HF). D12 Pcr: digestoimaton PCR-tuote. PTetlux-CDE-AB digest: digestoitu *luxCDE*-insertti (*EcoRI*-HF). PTetlux-CDE-AB plasmid: positiivinen kontrolli, kokonainen plasmidi.

Tehtiin jokaisesta vektorista (A2, B4, C7 ja D12) ja inserteistä (*luxCDE*) ligaatit. *E. coli* DH10B -bakteerisoluihin elektroporoidut ligoidut plasmidit tarkastettiin transformaation jälkeen (Siri-menetelmä), A2/11-, B4/5-, C7/9-, C7/11- ja D12/9-näytteet sisälsivät mahdollisen plasmidin (Kuva 22).



Kuva 22. Transformaation jälkeinen geelikuva plasmidin mahdollisesti sisältävistä bakteerisolusta A2/11, B4/5, C7/9, C7/11 ja D12/9. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). A2 1-11: eristetyt plasmidit. B4 1-11: eristetyt plasmidit. C7 1-11: eristetyt plasmidit. D12 1-11: eristetyt plasmidit. A2 kontr, B4 kontr, C7 kontr, D12 kontr: kokonaiset positiiviset kontrolliplasmidit (pUC19 + gDH10B, ilman *luxCDE*-pala).

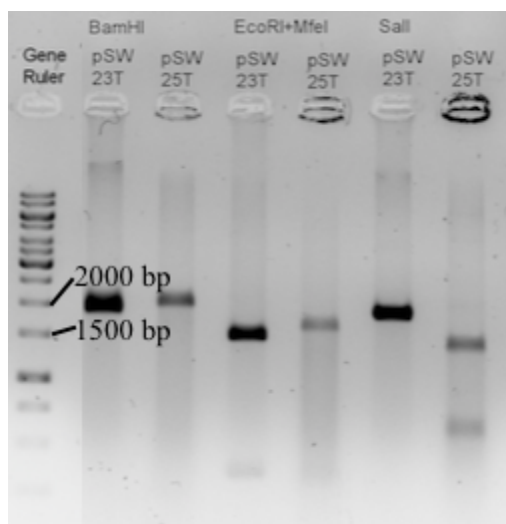
Plasmidien rakennetta tarkasteltiin koedigestoiden jälkeen ja kaupallisella tuotteella tehtyjen plasmidin eristysten jälkeen. Tupladigestiossa *EcoRI*-HF+*HindIII* ja *BamHI*-HF-digestiossa voitiin agaroosigeeliltä nähdä, että A2/11- ja B4/5-näytteistä eristetyt plasmidit olivat katkenneet oikean kokoisiksi DNA-fragmenteiksi. C7/9- ja C7/11-näytteiden plasmidit olivat katkenneet tupladigestiolla *EcoRI*-HF+*HindIII*, mutta olivat jääneet partiaalisiksi *SalI*-HF-entsyymireaktiossa. D12/9-näytteen plasmidi oli jäänyt hieman partiaalisiksi *EcoRI*-HF+*HindIII*-digestiossa, mutta *BamHI*-HF-digestiossa ei ollut irronnut pienempää DNA-fragmenttia. Tehtiin vielä uusintadigestiot D12/9-näytteen plasmidille *BamHI*-HF-entsyymillä ja C7/9- sekä C7/11-näytteiden plasmideille *SalI*-HF-entsyymillä. D12/9-näytteen plasmidi katkesi lineaariseen muotoon *BamHI*-HF-digestiossa, joten valittiin A2/11-, B4/5-, C7/9- ja C7/11-näytteet seuraavaan vaiheeseen (Kuva 23).



Kuva 23. Agaroosigeelikuva A2/11-, B4/5-, C7/9-, C7/11- ja D12/9-näytteiden plasmidien koedigestioista. GeneRuler: Molekyylilikostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Positiiviset kontrollit: pUC19 ja pUC19 kontr: digestoitu kontrolliplasmidi (*EcoRI*-HF+*HindIII*, *Sall*-HF, *BamHI*-HF). A2/11: digestoitu plasmidi (*EcoRI*-HF+*HindIII*, *BamHI*-HF). B4/5: digestoitu plasmidi (*EcoRI*-HF+*HindIII*, *BamHI*-HF). C7/9: digestoitu plasmidi (*EcoRI*-HF+*HindIII*, *Sall*-HF). C7/11: digestoitu plasmidi (*EcoRI*-HF+*HindIII*, *Sall*-HF). D12/9: digestoitu plasmidi (*EcoRI*-HF+*HindIII*, *BamHI*-HF). A2 kontr, B4 kontr, C7 kontr, D12 kontr: digestoidut kontrolliplasmidit (pUC19 + gDH10B, ilman *luxCDE*-pala) (*EcoRI*-HF+*HindIII*, *BamHI*-HF, *Sall*-HF).

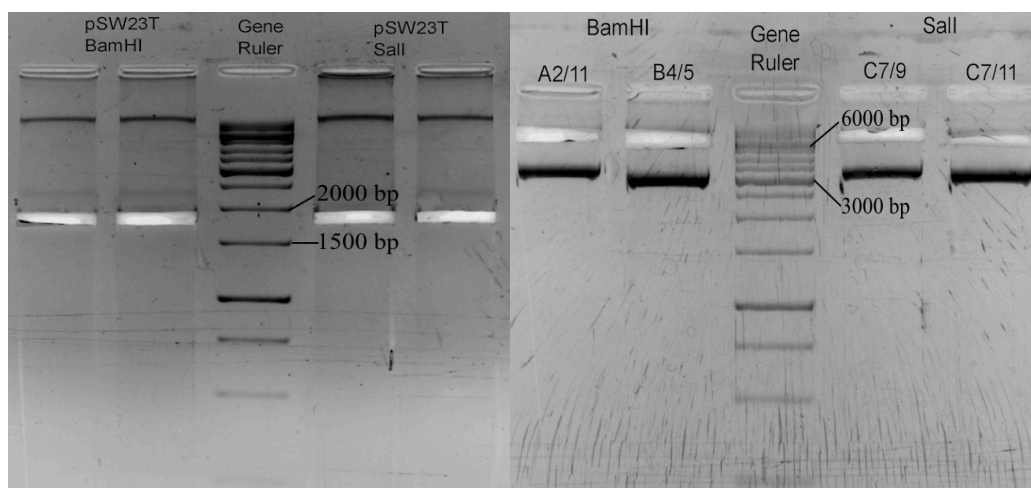
9.4 Itsemurhavektorin pSW23T valmistus

E. coli BW19610 -bakteerikannasta eristetty plasmidi pSW23T koedigestiot *BamHI*-HF-, *EcoRI*-HF+*MfeI*- ja *Sall*-HF-entsyymeillä onnistuivat hyvin. Kontrollina käytettiin pSW25T-plasmidia (Kuva 24).



Kuva 24. Agarosigeelikuva pSW23T plasmidin koedigestioista. GeneRuler: Molekyyli-
kokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pSW23T: digestoitu plasmidi
(*Bam*HI-HF, *Eco*RI-HF+*Mfe*I, *Sal*I-Hf) pSW25T: positiivinen kontrolli (*Bam*HI-HF,
*Eco*RI-HF+*Mfe*I, *Sal*I-Hf).

Preparatiivisen geelin kaikki plasmidit katkesivat kahteen osaan. Digestoidut (*Bam*HI-HF, *Sal*I-HF) pSW23T-vektorifragmentit (noin 1500-2000 bp) ja digestoidut (*Bam*HI-HF) A2/11-, B4/5-inserttifragmentit (yli 6000 bp) sekä C7/9-, C7/11-inserttifragmentit (yli 6000 bp) leikattiin talteen. Inserttien koosta havaittiin, että ne sisälsivät *gDH10B* ja *luxCDE*-geenialueen (Kuva 25).

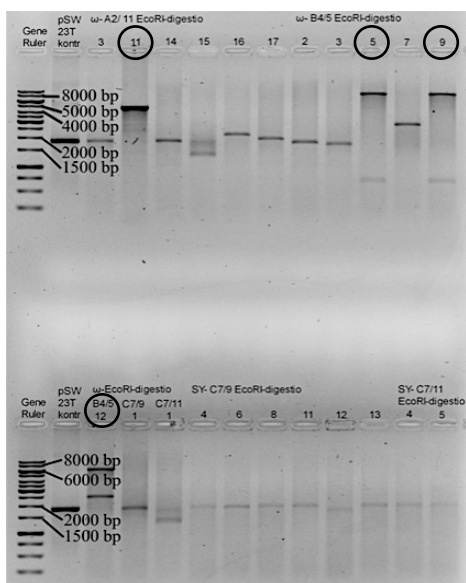


Kuva 25. Preparatiiviset geelikuvat digestoiduista pSW23T-vektoreista ja A2/11-, B4/5-, C7/9- ja C7/11-inserteistä. Vasemmalla vektorit, oikealla insertit. GeneRuler: Molekyyli-
kokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). pSW23T: digestoitu vektorifrag-
mentti (*Bam*HI-HF, *Sal*I-HF). A2/11, B4/5: digestoitu inserttifragmentti (*Bam*HI-HF).
C7/9, C7/11: digestoitu inserttifragmentti (*Sal*I-HF).

9.5 Insertin siirto pSW23T-itsemurhavektoriin

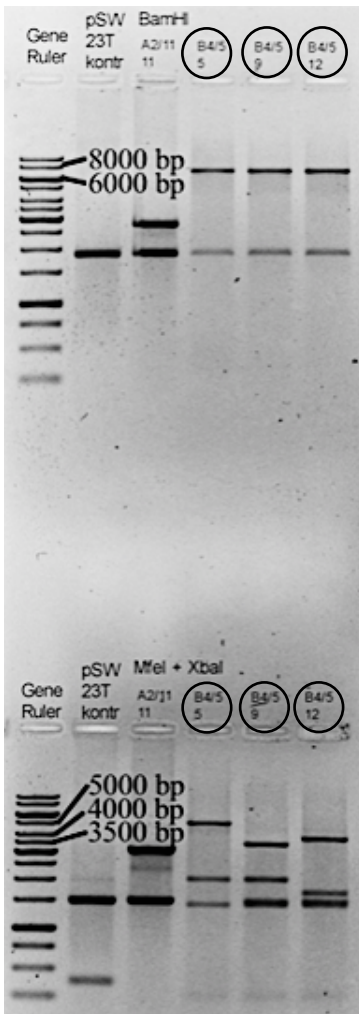
Preparatiiviselta agarosigeeliltä eristettyjen vektori- ja inserttifragmenttien ligaation onnistuminen, elektroporaation jälkeen, todettiin Siri-menetelmän avulla. Menetelmällä eristettiin 59 näytteestä mahdolliset plasmidit. Kromosomaalinen DNA näkyi agarosigeelillä hyvin ylempänä, mutta alempana oleva mahdollinen plasmidi näkyi heikosti. Valittiin mahdollisen plasmidin sisältävät näytteet geeliltä ottamalla eri kokoisia DNA-juovia muodostavia näytteitä (A2/11: 6 näytettä, B4/5: 6 näytettä, C7/9: 6 näytettä, C7/11: 2 näytettä) plasmidin eristykseen kaupallisella tuotteella ja koedigestioihin.

Plasmidien eristyksen ja *EcoRI*-HF-digestion jälkeen koedigestiogeelillä havaittiin neljä plasmidia A2/11: 11, B4/5: 5, 9, 12 jotka saattoivat sisältää (gDH10B + *luxCDE*) insertin (Kuva 26).



Kuva 26. Koedigestioagarosigeelikuva mahdollisen gDH10B + *luxCDE*-fragmentin sisältävistä pSW23T-plasmideista. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). A2/11 3, 11, 14, 15, 16, 17: digestoitu plasmidi (*EcoRI*-HF). B5/5 2, 3, 5, 7, 9, 12: digestoitu plasmidi (*EcoRI*-HF). C7/9 1, 4, 6, 8, 11, 12, 13: digestoitu plasmidi (*EcoRI*-HF). C7/11 1, 4, 5: digestoitu plasmidi (*EcoRI*-HF). pSW23T: positiivinen kontrolli, digestoitu pSW23T plasmidi (*EcoRI*-HF).

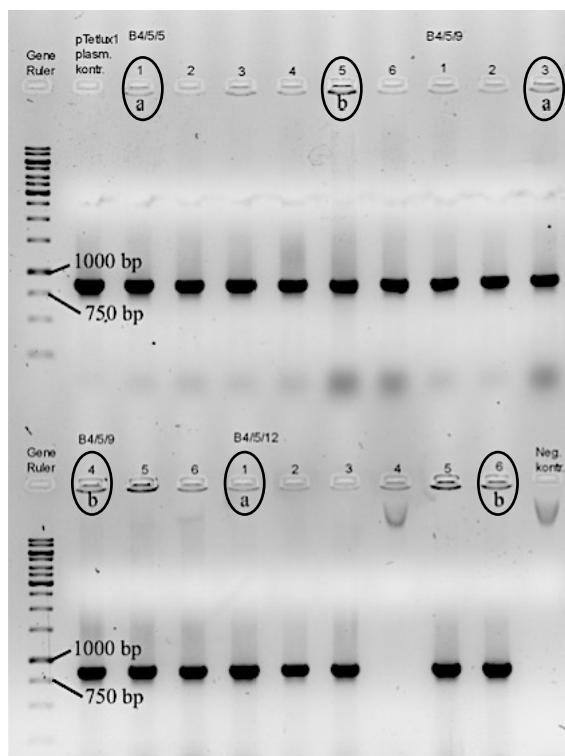
*Bam*HI-HF-digestion ja *Mfe*I+*Xba*I-tupladigestion avulla voitiin agarosigeeliltä havaita, että B4/5 5, 9 ja 12 näytteet olivat oikean kokoisia. Valittiin kaikki kolme näytettä konjugatioon isäntäbakteeri #6152 *E. coli* DH5alphan kanssa (Kuva 27).



Kuva 27. Agarosoigeelikuva koedigestioista plasmideille A2/11/11, B4/5/5, B4/5/9 ja B4/5/12. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). A2/11: digestoitu plasmidi (*Bam*HI-HF, *Mfe*I+*Xba*I). B4/5 5, 9, 12: digestoitu plasmidi (*Bam*HI-HF, *Mfe*I+*Xba*I). pSW23T: positiivinen kontrolli, digestoitu pSW23T-plasmidi (*Eco*RI-HF, *Mfe*I+*Xba*I).

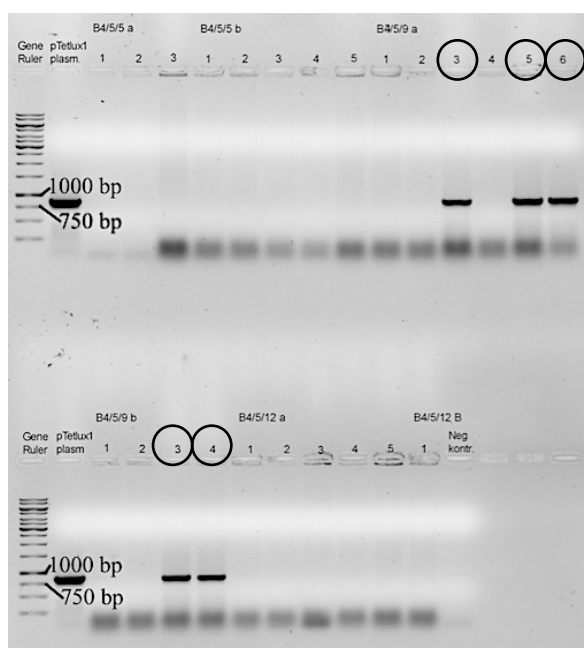
9.6 Konjugaatio

Konjugaation onnistumista analysoitiin pesäke-PCR:n avulla monistamalla plasmidin sisältämää *luxCDE*-geeniä. Agarosoigeeliltä havaittiin, että lähes jokainen näyte sisälsi oikean insertin, ainoastaan B4/5/12: 4 oli negatiivinen. Valittiin jokaisesta näytteestä a- ja b-pesäke nuorennoskasvatuksiin (Kuva 28).



Kuva 28. Agarosigeelikuva pesäke-PCR:lla monistetuista *luxCDE*-tuotteista. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). B4/5/5 1-6: *luxCDE*-PCR-tuote. B4/5/9 1-6: *luxCDE*-PCR-tuote. B4/5/12 1-6: *luxCDE*-PCR-tuote. pTetlux1 plasm. kontr: positiivinen kontrolli, pTetlux1-plasmidi. Neg.kontr: negatiivinen kontrolli.

Liemikasvatusten 3. nuorennoksesta (B4/5/5 a ja b, B4/5/9 a ja b B4/5/12 a ja b) viljellyillä maljoilla (6 kpl) kasvoi noin 100 pesäkettä/malja. Jokaiselta maljalta siirrostettiin 50 pesäkettä LA- ja LA-kloramfenikoli (20 µg/ml) -maljoille, joilla näytteet seulottiin. Bakteerit, jotka kasvoivat heikosti tai eivät ollenkaan, kloramfenikolin läsnä ollessa, monistettiin pesäke-PCR:n avulla. Agarosigeelillä näkyi viisi näytettä, B4/5/9 a: 3, 5, 6 ja B4/5/9 b: 3, 4, jotka sisälsivät *luxCDE*-insertin (Kuva 29).

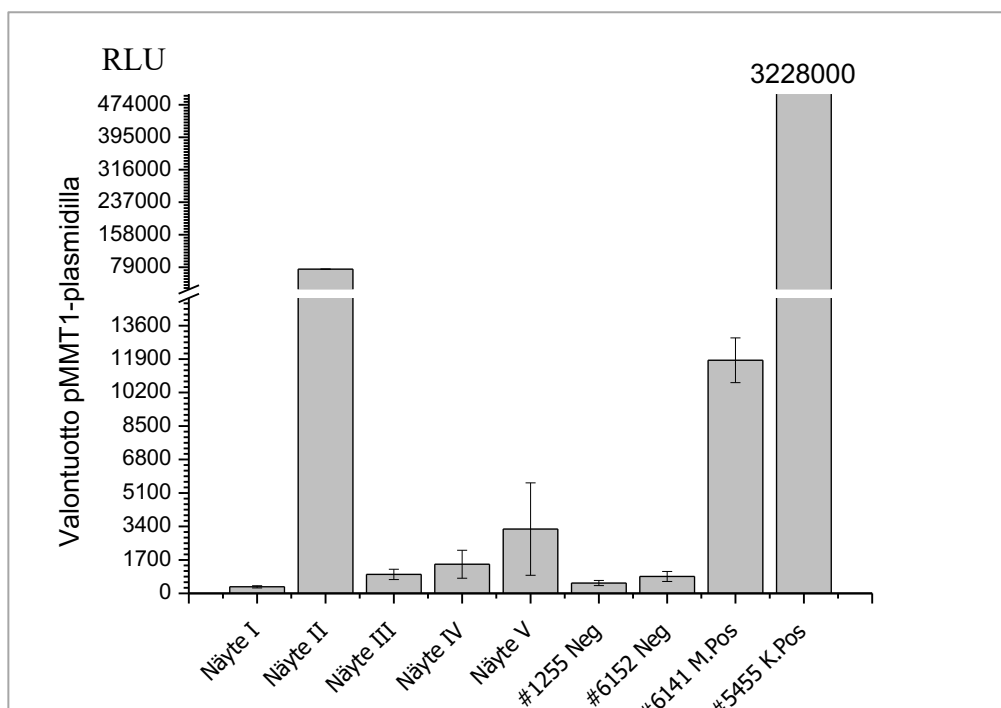


Kuva 29. Agarosigeelikuva pesäke-PCR:lla monistetuista nuorennosten jälkeisistä bakteerisolusta, jotka mahdollisesti sisälsivät *luxCDE*-insertin. GeneRuler: Molekyylikokostandardi 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). B4/5/5 a 1-3: pesäke-PCR-tuote. B4/5/5 b 1-5: pesäke-PCR-tuote. B4/5/9 a 1-6: pesäke-PCR-tuote. B4/5/9 b 1-4: pesäke-PCR-tuote. B4/5/12 a 1-5: pesäke-PCR-tuote. B4/5/12 b 1: pesäke-PCR-tuote. pTetlux1 plasm: positiivinen kontrolli pTetlux1-plasmidi. Neg. kontr: negatiivinen kontrolli.

Viittä mahdollisen *luxCDE*-insertin sisältävää näytettä monistettiin pesäke-PCR:lla seitsemällä alukeparilla (Taulukko 5, merodiploidin varmistus, alukeparit 1-7), jotta havaittiin, oliko toinen rekombinaatio tapahtunut. Näytteet ajettiin agarosigeelille, josta voitiin havaita, että B4/5/9 a: 3, 5 ja 6 näytteet olivat edelleen merodiploideja.

9.7 Valontuoton testaus pMMT1-plasmidilla ja merodiploideilla

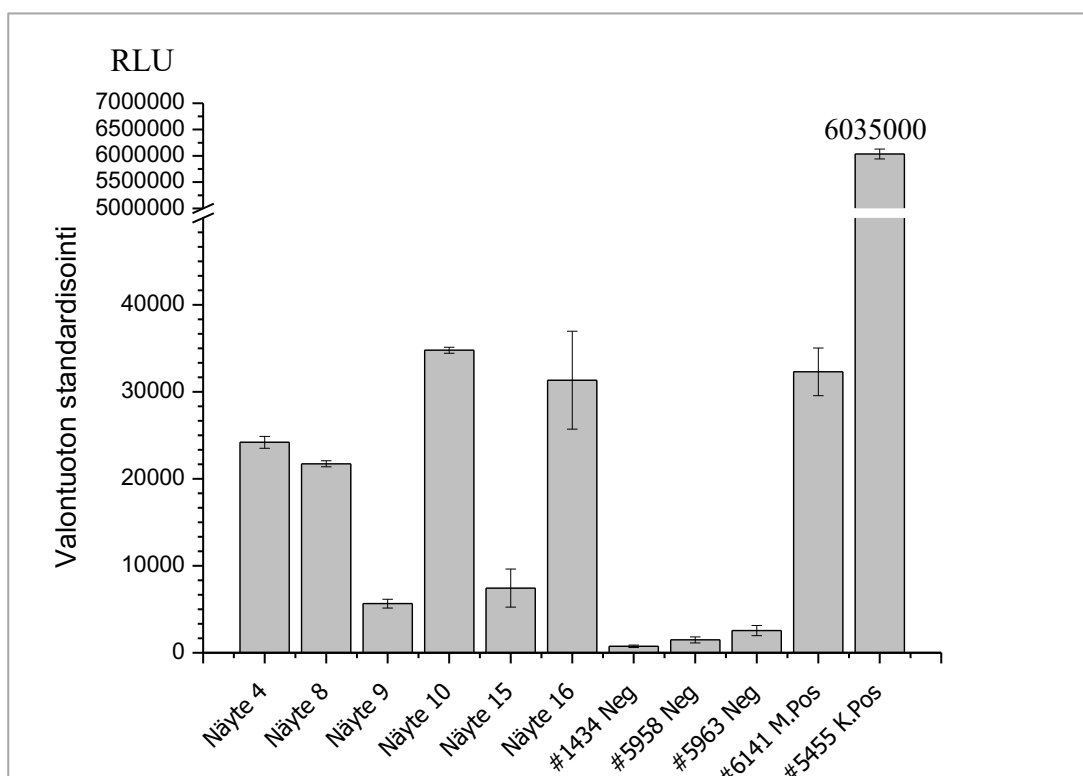
Merodiploideista B4/5/9 a3, B4/5/9 a5 ja B4/5/9 a6 valmistettiin elektrokompotentteja soluja joihin elektroporoitiin pMMT1-plasmidia. Ainoastaan B4/5/9 a5 solujen puhdasviljelmillä näkyi kunnollista bakteerikasvua. Viidestä erillispesäkkeestä tehtiin LB-liemikasvatukset, joiden valontuottoa mitattiin vuorokauden kasvatuksen jälkeen kontrollien läsnä ollessa. Jokaisesta näytteestä tehtiin neljä rinnakkaista mittausta. Näytteet II ja V tuottivat eniten valoa (Kuva 30).



Kuva 30. Valontuoton testaus. Pystyjanat kuvaavat vaihteluväliä neljän rinnakkaisen näytteen välillä. Näyte I: 333 RLU. Näyte II: 74 365 RLU. Näyte III: 965 RLU. Näyte IV: 1 479 RLU. Näyte V: 3 268 RLU. #1255 Neg: negatiivinen kontrolli 525 RLU. #6152 Neg: negatiivinen kontrolli 859 RLU. #6141 M.Pos: matala positiivinen kontrolli 11 842 RLU. #5455 K.Pos: korkea positiivinen kontrolli 3 227 850 RLU.

9.8 Valontuoton standardisointi kontrollikannoilla

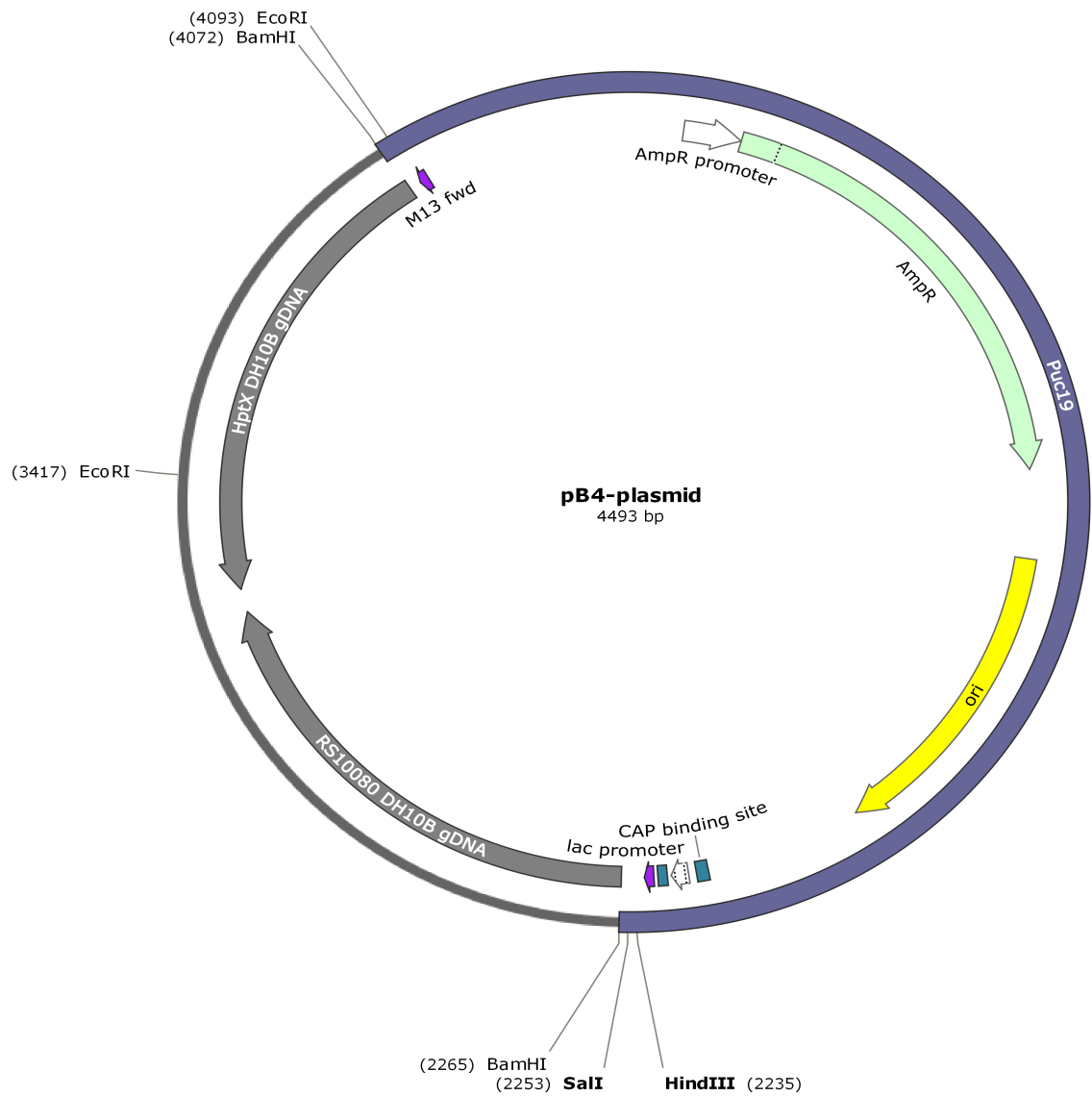
Valontuottoa testattiin uudestaan kontrollikannoilla, joiden tiedettiin tuottavan valoa *luxAB*-geeniin yhdistämällä. Kontrollikannoista #5958 *E. coli* Sy327/pEfB6 pSW23T (ClmR) ja #5963 *E. coli* Sy327/pEfB7-a pKNG101 (StreptR) valmistettuihin soluihin elektroporoitiin pMMT1-plasmidia. Transformanteista valittiin kaksi pesäkettä (Näytteet 4 ja 8) #5958 *E. coli* Sy327/pEfB6 pSW23T (ClmR) -soluista ja neljä pesäkettä (Näytteet 9, 10, 15 ja 16) #5963 *E. coli* Sy327/pEfB7-a pKNG101 (StreptR) -soluista. Jokaisesta näytteestä tehtiin neljä rinnakkaista mittausta kuten edellä. Jokainen näyte tuotti valoa (Kuva 31).



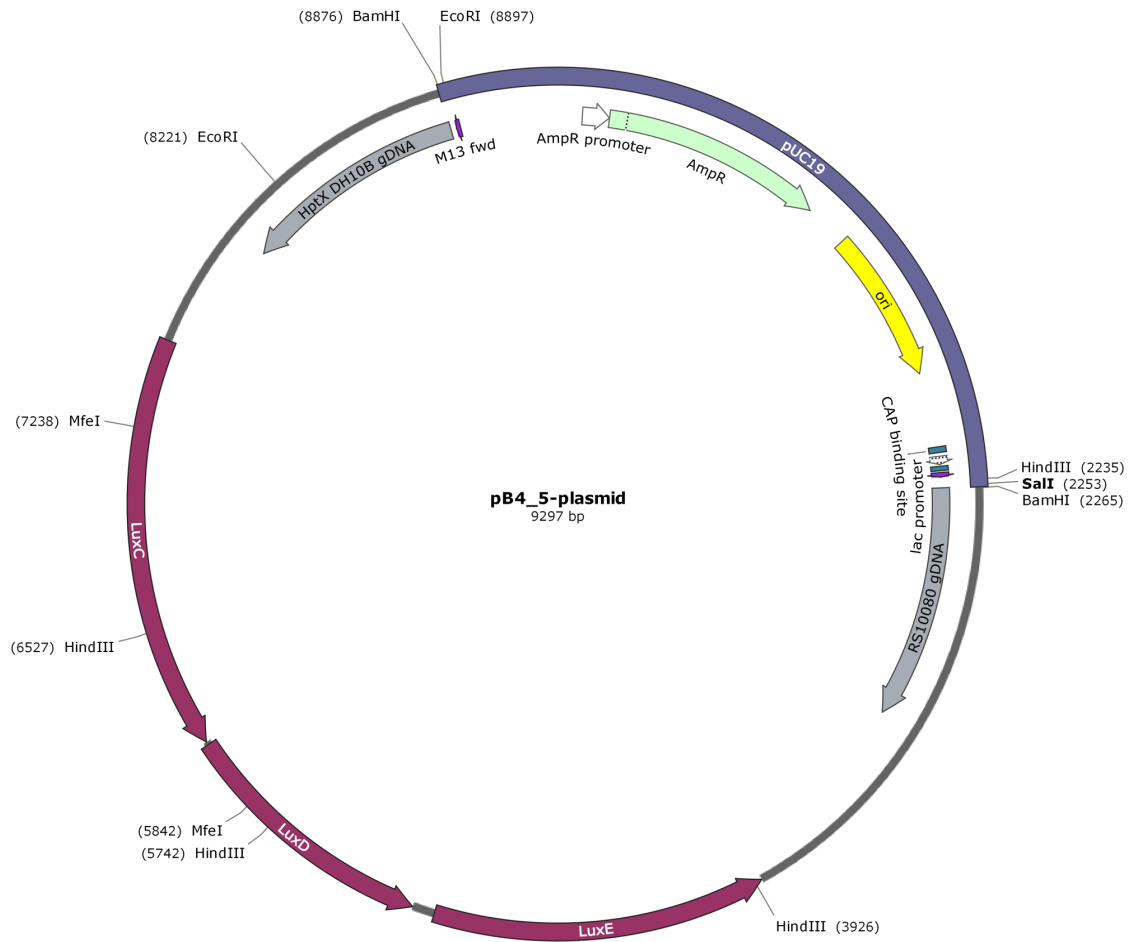
Kuva 31. Valontuoton standardisointi. Pystyjanat kuvaavat vaihteluväliä neljän rinnakkaisen näytteen välillä. Näyte 4: 24 196 RLU. Näyte 8: 21 729 RLU. Näyte 9: 5 650 RLU. Näyte 10: 34 782 RLU. Näyte 15: 7 434 RLU. Näyte 16: 31 338 RLU. #1434 Neg: negatiivinen kontrolli 751 RLU. #5958 Neg: negatiivinen kontrolli 1 482 RLU. #5963 Neg: negatiivinen kontrolli 2 550 RLU. #6141 M.Pos: matala positiivinen kontrolli 32 306 RLU. #5455 K.Pos: korkea positiivinen kontrolli 6 034 905 RLU.

9.9 Plasmidien sekvensointi ja kuvittaminen

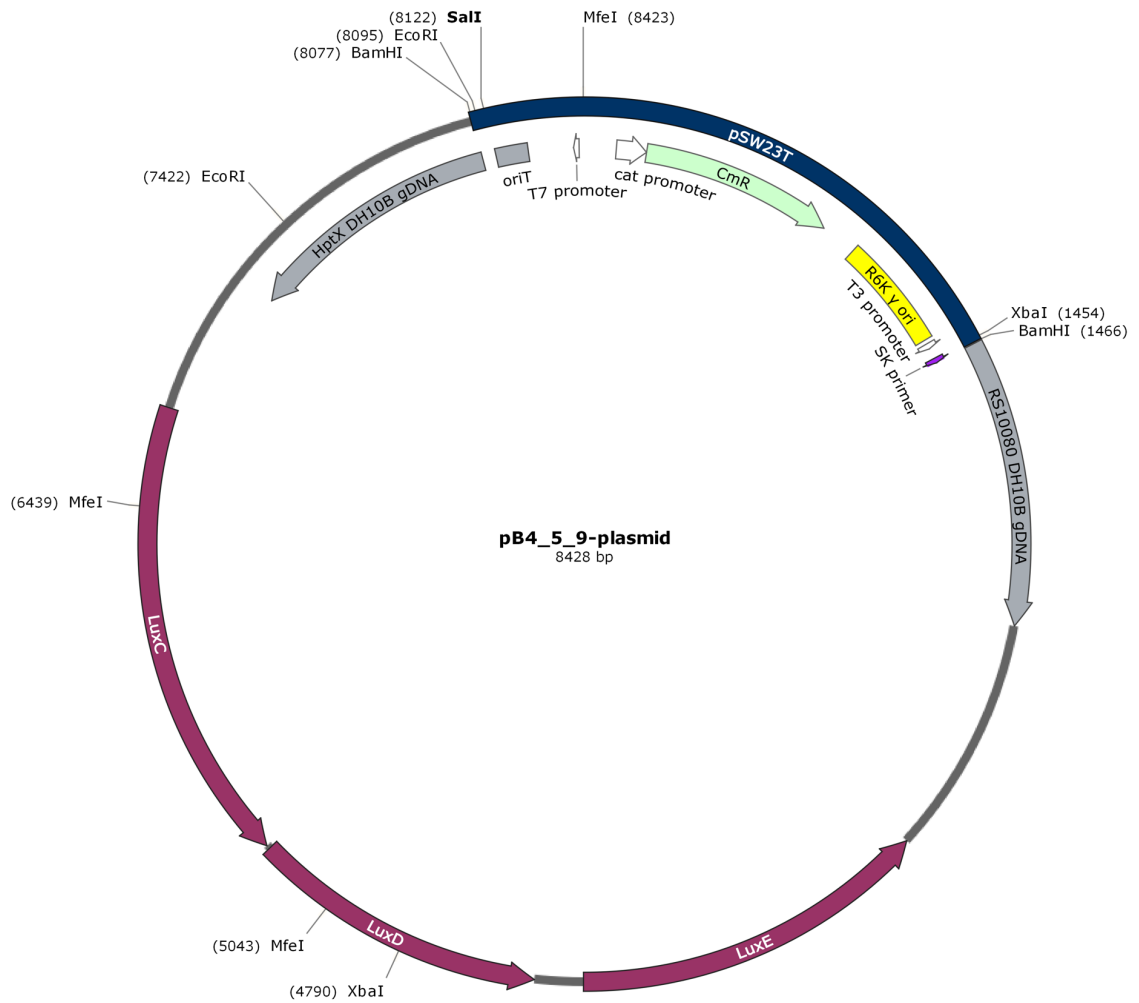
FIMM:iin lähetettyjen kolmen plasmidin pB4, pB4_5 ja pB4_5_9 sekvenssien (Liite 4, 5 ja 6) saavuttua piirrettiin plasmidit SnapGene® Viewer 4.1.4 -ohjelman avulla (GSL Biotech LLC, USA). Plasmidit olivat kuvissa mittasuhteiltaan oikean kokoisia (Kuva 32, 33 ja 34).



Kuva 32. pB4_plasmidi, jossa pUC19-vektori ja gDH10B-insertti. Piirretty sekvensointi-datasta SnapGene® Viewer 4.1.4 -ohjelman avulla.



Kuva 33. pB4_5-plasmidi, jossa pUC19-vektori ja gDH10B-insertti, jonka keskellä *luxCDE*-geenialue. Piirretty sekvensointidatasta SnapGene® Viewer 4.1.4 -ohjelman avulla.



Kuva 34. pB4_5_9-plasmidi, jossa pSW23T-vektori ja gDH10B-insertti, jonka keskellä *luxCDE*-geenialue. Piirretty sekvensointidatasta SnapGene® Viewer 4.1.4 -ohjelman avulla.

10 TULOSTEN TARKASTELU

Bakteriofagit pystyvät tuottamaan lukuisia erilaisia proteiineja. Geeneistä riippuen proteiinit voivat olla joko toksisia tai eivät. Tässä tutkimuksessa pystytettiin menetelmä, jolla voidaan seuloa toksisia proteiineja tuottavia tuntemattomia faagigeenejä. Reportterivektoriin kloonattiin *luxAB*-geenit ja itsemurhavektoriin *luxCDE*-geenit. Itsemurhavektorin integroitua isäntäbakteeriin muodostui merodiploidi, joka yhdessä reportterivektorin kanssa muodosti *luxCDABE*-geenikasetin. Tämä geenikasetti tuotti luminoivaa valoa. Standardisoinnilla nähtiin, että reportteriplasmidi toimi halutulla tavalla ja että valontuotto oli mahdollista jokaisessa isäntäbakteerissa.

10.1 pMMT1-plasmidin kloonaus

pMMT1-plasmidin muodostaminen onnistui ilman ylimääräisiä työvaiheita. PCR-alukkeet olivat spesifisiä ja tuotetta saatiin tarpeeksi. Ainoastaan *luxAB*-PCR-tuote (pTetlux1-CDE) digestoitiin uudestaan, sillä se oli hajonnut ensimmäisessä digestiossa tai mennyt yksijuosteiseksi (Kuva 9). Tämä saattoi johtua inaktivoinnista. Valmistajan ohjeiden mukaan *EcoRI*-HF-digestioentsyymi inaktivoidaan 65 °C 20 min, mutta *BamHI*-HF-entsyymille inaktivoimista ei tehdä, joten toinen onnistunut digestio toistettiin ilman sitä (Biolabs Inc.). Elektrokompentit DH10B *E. coli* -solut toimivat transformaatioissa hyvin, kuten jo Hanahan (1983) todisti tutkimuksessaan, sillä maljoilla kasvoi runsaasti pesäkkeitä. Siri-menetelmällä eristettyjä plasmideja seulottiin agarosigeeliltä vertaamalla niitä eristettyyn pUC19-plasmidiin, joka oli pienempi kuin mahdollisen insertin sisältävä plasmidi. Suurempia plasmideja näkyi geelillä kaksikymmentäyksi kappaletta (Kuva 10). Valittiin kuitenkin vain kuusi näytettä jatkoon (e, f, g, h, i, j). Koedigestioiden avulla seulottiin neljä oikean kokoisiksi paloiksi digestoituvaa plasmidia, joista valittiin kaksi (h ja i) sekvensoitavaksi. Saapuneiden sekvenssien perusteella valittiin toinen plasmideista (i), josta piirrettiin malliplasmidi pMMT1 (Kuva 13). Sekvenssin valinta tapahtui juosteen sisällön perusteella. Valittiin plasmidi, jonka DNA sisälsi vähemmän virheitä (Kearse ym. 2012).

10.2 Itsemurhaplasmidin kloonauk

Itsemurhavektorin valmistuksessa käytettiin neljää erilaista genomista geenialuetta, joiden valinta perustui niiden transkriptioon. gDNA:n kloonauk itsemurhavektoriin suunniteltiin isäntäbakteerin ja plasmidin välisen rekombinaation perusteella. Työhön valittiin geenialueet, joilla transkriptio oli voimakasta (RNA seq intensity high). Tasot tarkistettiin *E. coli* DH10B:n RNA:n sekvensointi datasta. Suunnitellulla A-plasmidilla se oli noin 100, B-plasmidilla noin 200, C-plasmidilla noin 140 ja D-plasmidilla noin 900. B- ja C-plasmidien geenialueet olivat hyvin samankaltaisia keskenään (Carver ym. 2012).

Genomiset alueet monistettiin PCR:n avulla, jonka jälkeen DNA-palan insertoiminen pUC19-plasmidiin onnistui hyvin. Plasmidia käytetään yleisesti geenitekniikan töissä, sillä sen sisältämät geenit ja restriktiokohdat ovat hyvin tunnettuja sekä sillä on korkea kopiokku (Yanisch-Perron ym. 1985). A-näytteen gDH10B-fragmentti näytti denaturoituneen digestiota edeltävässä puhdistuksessa (Kuva 16), tästä huolimatta ligaatio ja elektroporaatio onnistuivat. Jokaisen näytteen maljalla nähtiin runsaasti pesäkkeitä. Koedigestioita jouduttiin tekemään hieman enemmän, sillä jostain syystä A-, B- ja D-plasmitit digestoituivat ensimmäisissä digestioissa heikosti. C-näytteiden uusintadigestio *SalI*-HF:llä jäi myös osoittaiseksi, vaikka ensimmäinen digestio oli onnistunut (Kuva 17). Toinen digestio toistettiin samoilla valmistajan ohjeilla, joten syytä digestion epäonnistumiseen ei voitu päätellä. Entsyymien aktiivisuuteen on voinut vaikuttaa jatkuva pakastus ja sulatus. Lopulta valittiin näytteet A2, B2, B4, C3, C7, D5 ja D12 *luxCDE*-palan insertointi vaiheeseen (Kuva 18 ja 19).

luxCDE-palan insertoiminen kahden genomisen palan (gDH10B) keskelle aloitettiin monistamalla plasmidia käänteisellä PCR:lla. Agarosigeeliltä voitiin nähdä, että A2-näyte sisälsi runsaasti epäspesifistä DNA:ta ja D5-näytteestä muodostui kaksi tuotetta. C3- ja C7-näytteet olivat monistuneet halutulla tavalla. Valittiin yksi jokaisen geenialueen omaavasta näytteestä jatkoon, A2, B4, C7 ja D12, sillä haluttiin käyttää erilaisia transkriptiovoimakkuuden omaavia vektoreita (Kuva 20). Vektoreiden rakenteita havainnoitiin digestioiden jälkeen agarosigeeliltä. Geeliltä havaittiin, että D12-näytteen konsentraatio oli todella alhainen (Kuva 21). Päätettiin kuitenkin tehdä ligaatio ja transformaatio myös tästä näytteestä, sillä sen geenialueen transkriptio oli datan mukaan voimakkainta. Agarosigeeliltä valittiin jatkoon näytteet, joissa näkyi selkeästi yläjuovan muodostava gDNA ja hieman alempana olevan DNA-juovan muodostama mahdollinen plasmidi (Kuva 22). Koedigestiot

jäivät hieman osittaisiksi osassa näytteistä, joten uusittiin digestioita. Uusintakoedigestiogeeliltä nähtiin, että C7/9- ja C7/11-plasmidien digestio onnistui hyvin ja että ne katkesivat oikean kokoisiksi paloiksi. Agarosigeeliltä nähtiin myös, että D12/9-plasmidi ei mahdollisesti sisältänyt toista *Bam*HI-katkaisukohtaa sillä DNA ei katkennut kahteen osaan. Näytti siltä, että toinen gDNA-alueista olisi tuhoutunut, ja että plasmidi katkeaisi lineaariseen muotoon (Kuva 23). Valittiin näytteet A2/11, B4/5, C7/9 ja C7/11 seuraavaan vaiheeseen.

Näytteistä irroitettiin digestioiden avulla insertit, jotka siirrettiin pSW23T-vektoreihin. Elektroporaation jälkeen tehdyllä Siri-menetelmällä oli hankala erottaa agarosigeeliltä plasmidin sisältäviä näytteitä. Tämä saattoi johtua siitä, että menetelmä sisältää manuaalisia työvaiheita, joten sen toistettavuus ei ole niin optimoitua kuin kaupallisilla tuotteilla. Plasmidien seulonnassa tämä menetelmä kuitenkin toimii tarvittavalla tavalla. Kromosomaalisen DNA:n muodostavat juovat näkyivät selkeästi, mutta plasmidin muodostavaa DNA:ta oli vaikea havaita. Tästä syystä valittiin eri kokoisia DNA-juovia muodostavia näytteitä, jotta saatiin seulottua mahdollisimman monta eri tyyppistä näytettä. Koedigestioiden jälkeen agarosigeeliltä valittiin neljä näytettä (A2/11/11, B4/5/5, B4/5/9 ja B4/5/12), sillä muut plasmidit olivat kooltaan liian pieniä sisältääkseen oikean kokoisen insertin. Koedigestiogeeliltä *Bam*HI-HF-digestiossa voitiin havaita, että A2/11/11-näyte digestoitui liian pieniin fragmentteihin sisältääkseen insertin (Kuva 27). Valittiin näytteet B4/5/5, B4/5/9 ja B4/5/12 konjugaatioon.

10.3 Konjugaatio

Konjugaatio isäntäbakteeriin #6152 *E. coli* DH5alpha oli onnistunut 3 vrk:n jälkeen ja pesäkkeitä oli runsaasti. Konjugaation onnistuminen voitiin havaita agarosigeeliltä sillä pesäke-PCR tuotti halutun kokoisia DNA-juovia. *E. coli* DH5alpha ei tuota tiettyjä endonukleaaseja, esimerkiksi endA1:tä, ja näin ollen se on erittäin stabiili reportterivektorien kloonauksessa. Se sisältää *recA*-geenin mutaation, joten heterologista rekombinaatiota ei tapahdu (Bernstein & Berstein 2010, Cox ym. 1991, Invitrogen). Isäntäbakteeri toimi halutulla tavalla ja vain yksi näyte ei sisältänyt mahdollista plasmidia *luxCDE*-insertillä (Kuva 28). Valittiin jokaisesta kolmesta näytteestä B4/5/5, B4/5/9 ja B4/5/12 a ja b näytteet nuorennoskasvatuksiin. Nuorennoksista (nro. 3) viljeltyjä maljoja inkuboitiin yhteensä 2 vrk,

sillä pesäkkeiden kasvu oli hidasta, vaikka niitä oli runsaasti. Kasvua kuitenkin tapahtui hitaasti, joten päätimme pysytellä valitussa kasvualustassa. Pesäkkeitä seulottiin LA- ja LA-kloramfenikoli-maljoilla, sillä seulottava bakteeri sisälsi *clmR*-geenin. Osa näytteistä kasvoi heikosti myös kloramfenikolin läsnä ollessa, mutta päätettiin seuloa myös nämä näytteet pesäke-PCR:n avulla, että havaittiin, sisälsikö bakteeri edelleen plasmidin. Pesäke-PCR:lla monistettiin vain osaa insertistä, joten agarosigeeliltä nähtiin, että viisi näytettä B4/5/9 a3, B4/5/9 a5, B4/5/9 a6, B4/5/9 b3 ja B4/5/9 b4 sisälsivät mahdollisen *luxCDE*-insertin (Kuva 29). Näille viidelle näytteelle tehtiin vielä uusi pesäke-PCR, jotta nähtiin, oliko toinen rekombinaatio tapahtunut. Bakteerit olivat edelleen merodiploideja, joten toista rekombinaatiota ei ollut tapahtunut (Bernstein & Bernstein 2010). Toisen rekombinaation epäonnistuminen saattoi johtua isäntäbakteerista, kasvatusolosuhteista tai alustan sopimattomuudesta. Valittiin merodiploidi B4/5/9 a5 elektrokompetenttien solujen valmistukseen ja valon tuoton testaukseen, koska se kasvoi maljalla runsaimmin.

FIMM:stä saapuneet DNA-sekvenssit näytteistä B4, B4/5 ja B4/5/9 näyttivät lupaavilta. Sekvenssien avulla saatiin piirrettyä tarkat malliplasmidit pB4, pB4_5 ja pB4_5_9 (Kearse ym. 2012), jotka antoivat viitteitä siitä, että jokaisen vaiheen plasmidikonstruktioit olivat onnistuneet (Kuva 32, 33 ja 34).

10.3 Valontuoton testaus ja standardisointi

Valontuoton testauksessa pMMT1-plasmidin ja merodiploidin välillä voitiin nähdä, että bakteerit II, III, IV ja V tuottivat mahdollisesti valoa (Kuva 30). Verrattaessa näytteitä negatiivisiin kontrolleihin, havaittiin että näytteet II ja V tuottivat eniten valoa. Verrattessa muita näytteitä kontrolleihin valontuotto oli sen verran matalaa, että todellista luminesenssia oli hankala erottaa mahdollisen taustan luomista signaaleista.

Valon tuoton standardisointi pMMT1-plasmidin ja kontrollikantojen välillä tuotti valoa jokaisessa näytteessä (Kuva 31). Kontrollikannan #5958 *E. coli* Sy327/pEfB6 pSW23T (ClmR) näytteet 4 ja 8 olivat valon tuotoltaan samankaltaiset, kun taas kontrollikannan #5963 *E. coli* Sy327/pEfB7-a pKNG101 (StreptR) näytteissä oli eroavaisuuksia. Vaikka bakteerit 10 ja 16 tuottivat eniten valoa, oli valontuotto kaikilla bakteereilla havaittavissa. Standardisoinnissa nähtiin, että pMMT1-plasmidia voidaan käyttää jatkotutkimuksissa

luxCDE-geenikasetin sisältävien bakteerien kanssa. Sen sisältämä *ompF*-promoottori oli voimakkaasti ekspressoiva, geenikasettikonstruktio toimi oletetulla tavalla yhdistyessään ja tuottaessaan luminoivaa valoa, kuten Bozcal ym. (2017) jo aiemmin todisti.

Menetelmä todisti sen mikä oli aiemmin havaittu hiirillä tehdyissä kokeissa. Siinä eläimet infektoitiin injektoimalla tai oraalisesti *Yersinia enterocolitica* -bakteerilla, joka sisälsi luminoivan geenikasetin (*luxCDABE*). Geenikasetti tarvitsi metabolisesti aktiivisen bakteerin, johtuen sen kemiallisesta toimintamekanismista, sillä sen tuottama luciferaasi (*luxAB*) vaati entsyymien aktiivisuutta substraatin syntetisoimisessa (*luxCDE*) valoa tuottaakseen (Bozcal 2017, Leskinen ym. 2017, Trček ym. 2010). Tutkimuksessa havaittiin, että bakteerien luminoiva ominaisuus pysyi hiiristä viljellyissä bakteereissa neljä päivää (Trček ym. 2010). Tutkimuksissa *Yersinia enterocolitica* osoittautui erittäin stabiiliksi luminoivan geenikasettikonstruktion kanssa (Bozcal 2017, Leskinen ym. 2017, Trček ym. 2010). Tässä tutkimuksessa geenikasetti osoittautui myös stabiiliksi *E. coli* -bakteerin kanssa.

11 JOHTOPÄÄTÖKSET

Maisterintutkielmani tuloksista nähtiin, että *lux*-operonin pilkkominen onnistui hyvin, sillä *luxAB*-geeni saatiin liitettyä plasmidiin ja *luxCDE*-geeni itsemurhavektorin avulla kromosomiin. Testattaessa niitä yhdessä, ne tuottivat valoa, joten tämä tulos antoi viitteitä siihen, että pMMT1-plasmidia voitaisiin käyttää selvittämään faagigeenien tuottamien proteiinien toksisuutta. pMMT1-plasmidi toimi oletetulla tavalla sekä muodostetun merodiploidin että positiivisten kontrollikantojen kanssa. Plasmidin sisältämän *ompF*-promoottorin (*Y. enterocolitica* O:3) tiedettiin olevan voimakkaasti ekspressoiva, joten plasmidia voidaan jatkossa käyttää myös muissa *luxCDE*-geenin sisältävissä bakteerikannoissa (Lee ym. 2009).

Itsemurhavektorin valmistus onnistui lopulta hyvin. Siinä käytettiin neljää erilaista genomista geenialuetta, joiden transkriptiovoimakkuudet olivat erilaiset. D-vektorin geenialueen transkriptio oli voimakkainta verrattuna A-, B- ja C-vektoreihin. Tulokset antoivat viitteitä siihen, että D-näytteen vektorista puuttui toisen gDNA-alueen katkaisukohta, joten *luxCDE*-geeniä ei voitu liittää plasmidiin. Voimakkaan transkription kannalta tämä olisi ollut suotavaa, mutta lukuisista yrityksistä huolimatta sitä ei saatu onnistumaan. B-vektoriin, jossa oli toiseksi voimakkain transkriptio, *luxCDE*-geenin liittäminen onnistui. Joten

saimme lopulta muodostettua merodiploidin, jonka transkriptiovoimakkuuteen olimme tyytyväisiä.

Tutkimuksessani ei saatu merodiploidin jälkeistä toista rekombinaatiota tapahtumaan. Työssä käytettiin pienikokoista itsemurhavektoria, jolla ei ollut selektiota toiselle rekombinaatiolle kuten esimerkiksi *sacB*-geeniä, jota olisi voitu käyttää niin sanotusti toisen rekombinaation pakottamisessa (Geng ym. 2016, Pelicic ym. 1997). Merodiploidi on kuitenkin stabiilimpi, sillä se sisältää antibioottiresistenssigeenin, ja näin ollen sen käyttö on myös selektiivisempää ja tehokkaampaa jatkotutkimuksissa (Madigan ym. 2017). Toisaalta merodiploidin genomi sisältää niin sanottua turhaa gDNA:ta, joka olisi toisen rekombinaation yhteydessä hävitetty. Hiirikokeissa merodiploidia ei kannata käyttää, koska se sisältää antibioottigeenin, ja täten antibioottia tulisi syöttää hiirille jatkuvasti. *In vitro* -kokeissa se on käyttökelpoinen, sillä antibiootin lisääminen onnistuu vaivattomasti.

Standardisoinnin tulokset kertoivat siitä, että luminesenssin tuottama signaali erottui selkeästi ja menetelmä on helposti toistettavissa. Negatiivinen-, matala positiivinen- ja korkea positiivinen kontrolli yhdessä toimi väärrien positiivisten näytteiden seulonnassa erinomaisesti. Menetelmän havaittiin olevan tehokas ja luotettava sekä sen toistettavuus oli nähtävissä. Taloudelliselta kannalta menetelmän kustannukset pysyivät maltillisina, sillä reagenssien käyttö oli kohtuullista ja jätteen määrä vähäistä.

Puhdistetuista bakteriofaageista ei ole raportoitu sivuvaikutuksia ihmiselimestössä, mutta hallitsematonta geenien siirtymistä tai muita haittavaikutuksia ei ole vielä tutkittu tarpeeksi. Faagigeenien käyttö kliinisessä hoidossa on turvallisempaa, sillä näin voidaan erottaa niiden tuottamat spesifiset proteiinit tuntemattomista proteiineista ja niiden vaikutuksista. Faagigeenejä voidaan jatkossa käyttää erilaisten resistenttien infektioiden hoidoissa vaihtoehtona antibioottihoidoille ja vähentää näin syntynyttä antibioottiresistenssiä maailmanlaajuisesti. Bakteriofagien ja niiden geenien tuottamien proteiinien käyttö on jo aloitettu kaupallisessa käytössä, joten faagiterapia ja faagituotteiden hyödyntäminen tulee olemaan kliinisesti merkittävä hoitovaihtoehto tulevaisuudessa (Kiljunen & Skurnik 2018, Mohanraj ym. 2019, Spruit ym. 2019).

Reportterivektoriin voidaan jatkossa kloonata tuntemattomia faagigeenejä, kun halutaan selvittää, tuottavatko ne toksisia proteiineja vai eivät. Toksisten proteiinien tuotto vaikuttaa geenikasetin toimintaan siten, että luminoivaa valoa muodostavaa lusiferaasia ei synny

isäntäbakteerissa. Silloin kun valon tuottoa pystytään mittaamaan luminesenssin avulla, faagigeenien tuottamat proteiinit ovat ei-toksisia (Mohanraj ym. 2019).

Tämä työ aloitettiin osana kliinisiä faagiterapiakokeita. Tulevaisuuden jatkotutkimuksia on suoritettu *luxAB*-geenit sisältävän plasmidin testaamisella siten, että siihen on kloonattu tunnettuja kontrolligeenejä. Kontrolligeenien avulla on nähty, että plasmidi toimii halutulla tavalla, ja että menetelmä on luotettava (Mohanraj ym. 2019). Luotettavien tulosten pohjalta plasmidia voidaan käyttää diagnostiikassa selvittäessä tuntemattomien faagigeenien tuottamien proteiinien toksisuutta. Jatkotutkimuksiin on valittu kliinisesti merkittäviä bakteriofagikantoja, joiden valinta on suoritettu niiden isäntäbakteerispesifisyyden mukaan (Spruit ym. 2019).

12 KIITOKSET

Haluan kiittää Per Sarista tuesta ja avuliaista neuvoista. Hänen ansiostaan pääsin tekemään maisterintutkielmaani parhaaseen mahdolliseen tutkimusryhmään.

Kiitän professori Mikael Skurnikia mahdollisuudesta tehdä maisterintutkielma hänen tutkimusryhmässään ja siitä että sain jatkaa projektia myös tämän jälkeen. Työ oli sopivan haastavaa ja tutkimusryhmän työilmapiiri erittäin mukava. Kiitän myös siitä, että sain oppia paljon uutta lähes päivittäin.

Erityiskiitokset ohjaajalleni dosentti Maria Pajuselle, joka jaksoi aina opastaa ja neuvoa. Haluan osoittaa kiitollisuutta hänen loputtomasta kärsivällisyydestään sekä laboratoriossa että sen ulkopuolella.

Iso kiitos myös dosentti Saija Kiljuselle, jonka kokemuksesta oli apua vaikeissa tilanteissa. Haluan lisäksi kiittää kaikkia työtovereitani auttamisesta ja kokemusten jakamisesta.

Viimeinen kiitos perheelleni ja ystävilleni, jotka jaksoivat kannustaa, tukea ja auttaa opiskelujeni ajan sekä maisterintutkielmaa tehdessäni.

LÄHTEET

- Abedon S. T., Thomas-Abedon C., Thomas A. & Mazure H. 2011. Bacteriophage prehistory is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Landes Bioscience. Bacteriophage* 1(3), 174-178.
- Ackermann H. W. 1998. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Advances in Virus Research* 51: 135-201.
- Ackermann H. W. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology* 152: 227-243.
- Arcsott P. G. & Goldberg E. B. 1976. Cooperative action of the T4 tail fibers and baseplate in triggering conformational change and in determining host range. *Virology* 69(1): 15-22.
- Babic A., Guerout A. M. & Mazel D. 2008. Construction of an improved RP4 (RK2)-based conjugative system. *Research in Microbiology* 159: 545-549.
- Belas R., Mileham A., Cohn D., Hilman M., Simon M. & Silverman M. 1982. Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*. *Science* 218(4574): 791-793.
- Bernstein H. & Bernstein C. 2010. Evolutionary origin of recombination during meiosis. *BioScience* 60 (7): 498-505.
- Beuken E, Vink C. & Bruggeman C. A. 1998. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques* 24(5): 748-50.
- Biezka-Sarek M., Venho R. & Skurnik M. 2005. Role of YadA, Ail, and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infection and Immunity* 73(4): 2232-2244.
- Biolabs Inc. New England. Saatavilla: <https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/heat-inactivation> Viitattu: 10.7.2019.

Biorender-ohjelma. Saatavilla: <https://biorender.com/> Viitattu: 7.7.2019.

Blattner F. R., Plunkett G. III, Perna N. T., Glasner J. D., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B. & Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277(5331): 1453-1462

Bottone E. J. 2015. *Yersinia enterocolitica*: Revisitation of an enduring human pathogen. *Clinical Microbiol Newsletter* 37(1): 1-8.

Bozcal E., Dagdeviren M., Uzel A. & Skurnik M. 2017. *LuxCDE-luxAB*-based promoter reporter system to monitor the *Yersinia enterocolitica* O:3 gene expression *in vivo*. *PLoS One* 12(2): 0172877.

Butler, T. 2014. Plague history: Yersin's discovery of the causative bacterium in 1894 enabled, in the subsequent century, scientific progress in understanding the disease and the development of treatments and vaccines. *Clinical Microbiology and Infection* 20(3): 202-209.

Carver T., Harris S. R., Berriman M., Parkhill J. & McQuillan J. A. 2012. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 28 (4): 464-469. Saatavilla: [10.1093/bioinformatics/btr703](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703) Viitattu: 9.7.2019

Cox M. M. (1991). The RecA protein as a recombinational repair system. *Molecular Microbiology* 5(6): 1295-1299.

Davis B. D. 1968. Formation of merodiploids in matings with a class of Rec-recipient strains of *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60: 160-167.

Demarre G., Guérout A.-M., Matsumoto-Mashimo C., Rowe-Magnus D. A., Marlière P. & Mazel D. 2005. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range

- R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalpha) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Research in Microbiology* 156(2): 245-255.
- Dharmadi, Y., Murarka, A., & Gonzalez, R. 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering* 94(5): 821-829.
- Eaton M. D. & Bayne-Jones S. 1934. Bacteriophage therapy. *Journal of the American Medical Association*. 103(23): 1769.
- Fotadar, U., Zaveloff, P., & Terracio, L. 2005. Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology* 45(5): 403-404.
- Gaynes R. 2017. The discovery of Penicillin - new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging infectious diseases journal CDC*. 23(5): 849-853
- Geng S., Tian Q., An S., Pan Z., Chen X. & Jiao X. 2016. High-Efficiency, Two-step scarless-markerless genome genetic modification in *Salmonella enterica*. *Current Microbiology* 72:700-706.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166(4): 557-580.
- Hanna M. O., Stewart J. C., Carpenter Z. L. & Vanderzant C. 1977. Effect of heating, freezing, and pH on *Yersinia enterocolitica* -like organisms from meat. *Journal of Food Protection* 40(10):689-692.
- Hedman K., Heikkinen T., Huovinen P., Järvinen A., Meri S. & Vaara M. (toim.). 2010. *Mikrobiologia*. Teoksessa: *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*, kirja 1, 1. painos. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki, s. 177-184 ja 192-195.
- Invitrogen. Thermo Fisher. Subcloning Efficiency™ DH5α competent cells. Saatavilla: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18265017> Viitattu: 10.7.19.

- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P. & Drummond A. 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28 (12): 1647-1649. Saatavilla: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>. Viitattu: 11.7.2019.
- Keet E. 1974. *Yersinia enterocolitica* septicemia: source of infection and incubation period identified. *New York State Journal of Medicine* 74: 2226- 2230.
- Kiljunen S. 2006. Molecular biology, genetics and applications of yersiniophages. Väitöskirja. Turun Yliopisto. Saatavilla: http://www.helsinki.fi/yersinia/pdf_own/Kiljunen_PhDThesis.pdf. Viitattu: 2.1.2018.
- Kiljunen S. & Skurnik M. 2018. Faagiterapian nykytilanne. *Suomen sairaalahygienialehti*. 36: 60-63. Saatavilla: http://sshy.fi/data/documents/lehdet/18_2.pdf. Viitattu: 6.7.2019.
- Korpela M. T., Kurittu J. S., Karvinen J. T. & Karp M. T. 1998. A recombinant *Echerichia coli* sensor strain for the dection of tetracyclines. *Analytical Chemistry* 70:4457-4462.
- Lamberg A., Nieminen S., Qiao M. & Savilahti H. 2002. Efficient insertion mutagenesis strategy for bacterial genomes involving electroporation of *in vitro*-assembled DNA transposition complexes of bacteriophage Mu. *Applied and Environmental Microbiology* 68(2): 705-712.
- Langley L. 2019. How bioluminescence works in nature. National Geographic. Saatavilla: <https://www.nationalgeographic.com/animals/reference/bioluminescence-animals-ocean-glowing/>. Viitattu: 6.7.2019.
- Lee S.-Y. & Jeong K.-J. 2009. Method for extracellular production of target proteins employing *ompF* in *E. coli*. Saatavilla: <https://patentimages.storage.googleapis.com/e3/57/b8/59b97deff6c7d3/US7491528.pdf>. Viitattu: 8.7.2019

- Leskinen K., Varjosalo M. T., Li Z., Li C. M. & Skurnik M. 2015. The expression of the *Yersinia enterocolitica* O: 3 lipopolysaccharide O-antigen and outer core gene clusters is RfaH-dependent. *Microbiology* 161:1282-1294.
- Leskinen K, Pajunen M. I., Varjosalo M., Fernandez-Carrasco H., Bengoechea J. A. & Skurnik M. 2017. Several Hfq-dependent alterations in physiology of *Yersinia enterocolitica* O: 3 are mediated by derepression of the transcriptional regulator RovM. *Molecular Microbiology* 103(6): 1065-1091.
- Lumio J. Duodecim terveyskirjasto. 2018. *Yersinia*-infektiot (yersinioosi ja rutto). Saata-villa: https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00616. Viitattu: 6.7.2019
- Madigan M. T., Bender K. S., Buckley D. H., Sattley W. M. & Stahl D. A. 2017. Biology of microorganisms. Teoksessa: Brock biology of microorganisms. 15. painos. Pearson International Edition. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco. USA. S. 40, S. 142-145, S. 222, S. 266-271, S. 291, S. 349-363, S. 373, S. 388, S. 754, S. 517-518.
- Mavrich T. N. & Hatfull G. F. 2018. Bacteriophage evolution differs by host, lifestyle and genome. *Nature Microbiology* 2: 17112.
- Miller V. L. & Mekalanos J. J. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *Journal of Bacteriology* 170(6): 2575-2583.
- Mohanraj U., Wan X., Spruit C. M., Skurnik M. & Pajunen M. I. 2019. Identification of bacteriophage fR1-RT encoded toxic gene products as leads for new antibacterials. Julkaisematon maisterintutkielma, salainen määräaikaan asti.
- Pajunen M. 2001. Molecular analysis of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 -specific bacteriophage ΦYeO3-12. Väitöskirja. Turun Yliopisto.
- Pellic V., Jackson M., Reyrat J.-M., Jacobs W. R. Jr., Gicquel B. & Guilhot C. 1997. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (20): 10955-10960.

- Roach D. R. & Donovan D. M. 2015. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage* 5(3): e1062590.
- Rodou A., Dennis O., Stathopoulos A. & Stathopoulos C. 2010. Toxins and secretion systems of *Photorhabdus luminescens*. *Toxins* 2: 1250-1264. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153242/pdf/toxins-02-01250.pdf>. Viitattu: 6.7.2019.
- Rowe L., Dikici E. & Daunert S. 2009. Engineering bioluminescent proteins: expanding their analytical potential. *Analytical Chemistry* 81(21): 8662-8668.
- Räisänen S. & Alavaikko A. 1989. *Yersinia*-infektio hevosen puremasta. *Duodecim* 105: 1496-1497. Saatavilla: https://www.terveysportti.fi/d-htm/articles/1989_17_1496-1497.pdf Viitattu: 6.7.2019.
- Shulman S. T., Herbert C. Friedmann, Ronald H. Sims. 2007. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clinical Infectious Diseases* 45(8): 1025-1029
- Skurnik M. 1984. Lack of correlation between the presence of plasmids and fimbriae in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Applied Bacteriology* 56, 355-363.
- Skurnik M., Pajunen M. & Kiljunen S. 2007. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnology Letters*. 29(7): 995-1003.
- SnapGene® Viewer 4.1.4. GSL Biotech LLC, USA. Saatavilla: http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/. Viitattu 2.4.2017.
- Stern N. J., Pierson M. D. & Kotula A. W. 1980. Effects of pH and sodium chloride on *Yersinia enterocolitica* growth at room and refrigeration temperatures. *Journal of Food Science* 45(1): 64-67.
- Spruit, C. M., Wicklund, A., Skurnik, M. & Pajunen, M. I. (2019) The complete genome sequence of Klebsiella phage fHe-Kpn01 and the discovery of three toxic proteins encoded in its genome. Julkaisematon artikkeli.

- Szittner R. & Meighen E. 1990. Nucleotide-sequence, expression, and properties of luciferase coded by *lux* genes from a terrestrial bacterium. *The Journal of Biological Chemistry* 265(27): 16581-16587.
- Tagliabue A. & Rappuoli R. (2018). Changing priorities in vaccinology: Antibiotic resistance moving to the top. *Frontiers in Immunology* 9: 1068
- Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Bakteritaudit. Helsinki. Suomi. Saatavilla: <https://thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteritaudit>. Viitattu: 6.7.2019.
- Trček J., Fuchs T. M. & Trülsch K. 2010. Analysis of *Yersinia enterocolitica* invasion expression in vitro and in vivo using a novel *luxCDABE* reporter system. *Microbiology* 156: 2734-2745.
- Törrönen K. 2006. Solunetti. Itä-Suomen yliopisto. Saatavilla: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/>. Viitattu: 6.7.2019
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M. & Rozen S. G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40 (15): 115. Saatavilla: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. Viitattu 6.7.2019.
- Vaara M. & Saxén H. 1999. Uudet bakteerilääkkeet. *Duodecim* 115: 2259-2264.
- Vincze T., Posfai J. & Roberts R. J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. 31: 3688-3691. Saatavilla: 10.1093/nar/gkg526. Viitattu 14.11.2017.
- Wauters G., Kandolo K. & Janssens M. 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contributions to Microbiology and Immunology* 9: 14-21.
- Weinbauer M. G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 28(2): 127- 181.

WHO. World Health Organization. Antibiotic resistance. 2018. Saatavilla:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Viitattu:
6.7.2019

Wilson T. & Woodland Hastings J. 1998. Bioluminescence. Annual Review of Cell Developmental Biology. 14: 197-230.

Yanisch-Perron C., Vieira J. & Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. Gene 33(1): 103-119.

Zietz B. P. & Dunkelberg H. 2004. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. International Journal of Hygiene and Environmental Health 207(2): 165-178.

LIITE 1: Tutkimuksessa käytetyt ainesekokset

Luria Broth (LB -liemi)

10.0 g Tryptone (Lab M A Neogen® Company, REF MC005)

5.0 g Yeast extract (Lab M A Neogen® Company, REF MC001)

10.0 g NaCl (Fisher Scientific, REF BP358-212)

1000 ml mQ H₂O

pH ~7

LB -agar plates (LA -maljat)

6.0 g Bacto-agar (Agar No. 2 Bactriological, Lab M A Neogen® Company, REF MC006)

400 ml Luria Broth

SOB -broth (SOB -liemi)

20.0 g Tryptone (Lab M A Neogen® Company, REF MC005)

5.0 g Yeast extract (Lab M A Neogen® Company, REF MC001)

0.584 g NaCl (Fisher Scientific, REF BP358-212)

0.186 g KCl (Merck, REF 104936)

1000 ml mQ H₂O

pH ~7

S.O.C. broth (S.O.C. -liemi)

1 ml 2M Glucose, valmistettu: 36.04 glucose (Sucrose, Fisher Scientific REF 50-213-671), mQ H₂O 100 ml

1 ml 2M Mg²⁺, valmistettu: 20.33 g MgCl₂ x 6 H₂O (Merck REF 105833), 12.37 g MgSO₄ (Sigma-Aldrich REF M7506-M), 100 ml mQ H₂O.

98 ml SOB -broth

10 % Glyseroli

100 ml Glycerol (99.5 %, VWR BDH Chemicals, REF 24388.320)

900 ml mQ H₂O

30 % Glyseroli

300 ml Glycerol (99.5 %, VWR BDH Chemicals, REF 24388.320)

700 ml mQ H₂O

1XTAE -bufferi

4.84 g Tris (Trizma base, Sigma-Aldrich REF 93352)

500 ml mQ H₂O

2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), valmistettu: 18.61g Na₂EDTA x 2H₂O (Calbiochem, REF 324503), 80 ml mQ H₂O, NaOH pelleillä (Sigma-Aldrich S08899) pH 8.00, lopputilavuuden nosto 100 ml mQ H₂O.

1.14 ml glacial acetic acid (Fisher Scientific, REF UN2789)

-> nostettiin lopputilavuus 1000 ml mQ H₂O:lla

6XDYE (loading buffer) latauspuskuri

30 % Glyseroli, tilavuusprosenttia

0.25 % Bromophenol Blue, paino/tilavuusprosenttia (Sigma-Aldrich, REF 18030)

0.25 % Xylenecyanol FF, paino/tilavuusprosenttia (Sigma-Aldrich, REF 95600)

Kloroformi-fenoliseos

1 osa Chloroform (Fisher Scientific, REF UN1888)

1 osa Saturated Phenol (Fisher Scientific, REF UN2821)

NucleoBond Xtra Midi/Maxi- plasmidin eristys (Macherey-Nagel)

Isopropanoli (Propan-2-ol, Fisher Scientific REF UN1219)

70 % Etanoli, valmistettu: 70 ml ETAX AaS (Altia, REF UN1170), 30 ml mQ H₂O

LIITE 2: Työssä käytetyt laitteet ja niiden käyttötarkoitus

Merkki	Valmistaja	Valmistusmaa	Käyttötarkoitus
Avanti J-26 XPI centrifuge	Beckman Coulter Inc.	United States	Elektrokompetenttien solujen sentrifugaus
Certomat IS	B. Braun Biotech International Ag.	Germany	Liemiviljelmien kasvatus eri lämpötiloissa
FINEPCR AG-Rotator	Finemould Precision Ind. Co.	Korea	Eppendorf®-putkissa olevien näytteiden inkubointi +37 °C:ssa lämpöhuoneessa.
Electrophoresis Power Supply EPS-301	Amersham Pharmacia Biotech inc.	Sweden	Elektroforeesiajo
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Germany	Absorbanssin mittaustaus
Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Germany	Eppendorf®-putkissa olevien näytteiden sentrifugaus
Eppendorf Centrifuge 5804 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Germany	Falcon®-putkissa olevien näytteiden sentrifugaus
Eppendorf thermomixer 5355 comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH	Germany	Eppendorf®-putkissa olevien näytteiden inkubointi eri lämpötiloissa
Gel Doc™ XR+ Molecular Image	Bio-Rad Laboratories, Inc.	United States	Agaroosigeelin kuvantaminen
Gene Pulser II Apparatus/ Pulse Controller plus	Bio-Rad Laboratories, Inc.	United States	Elektroporaatio
Hidex Sense Microplate Reader	Hidex Oy.	Finland	Luminesenssin ja absorbanssin mittaustaus valontuotossa.
iCycler Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc.	United States	PCR
Nanodrop ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Inc.	United States	DNA-pitoisuuden mittaustaus
Sky line shaker DRS-12	ELMI ltd.	Riga	liemikasvatusten sekoittaminen huoneenlämmössä

LIITE 3: pMMT1 -plasmidin sekvenssi

gacgaaaggcctcgtgatacgcctatTTTTataggTaatgtcatgataataat-
 ggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaatgtgcgcggaacccctattgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagaca
 ataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagatgatgatt-
 caacatttccgtgctgcccttattccctttttgcgccatttgccttctggttttctcaccagaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagt
 tgggtgcacgagtggtttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatcctt-
 gagagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaaagtctgctatgtggcggtattatcccgattgacggcggaagagcaa
 ctccgtcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcaca-
 gaaaagcatcttaccgatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataacctgagtataacactgcccgaacttacttctgacaacgat
 cggaggaccgaaggagtaaccgtttttgcacaacatgggggatcatgtaactgcctt-
 gatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactatt
 aactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggtatggaggcgga-
 taaagtgcaggaccacttctgcgtcgccttccggctggctgtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgc
 agcactggggccagatggtgaagccctccgctatctgtagttatctacacgacggg-
 gagtgcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagtftactcatatat
 acttttagattgatttaaaacttatttttaattaaaaggatctaggtgaa-
 gatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgctccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaggatcttctgagatc
 ctttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctac-
 cagcgggtggtttgttccggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacacaatactgttctttagtgta
 gccgtagtttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgc-
 taatcctgttaccagtggtcgtgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggcggtggg
 ctgaacgggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcggaacgacctacaccgaactgaga-
 tacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttccgaaagggaagggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcgggaacaggaga
 gcgcacgagggagcttcagggggaaacgcctggtatcttta-
 tagtctgtcgggttgcgcacctctgacttgagcgtcgtgattttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgccagcaacgcggcc
 tttttaggttccgtggttctgtggttctgtggttctgtcacatgtt-
 ctttctgcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgccttgagtgcgtgataccgctcggcagccgaacgaccgagcgcagcaggt
 cagtgcagcaggaagcgggaagagcgcacaa-
 tacgcaaaccgcctctcccccgcggttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcacgca
 attaatgtgagttagctcactcattaggcaccacaggctttacactttatgctt-
 ccggctcgtatgtgttggaattgtgagcggataacaatttcacacggaacagctatgacctgattacgccaagcttgcagcctgcaggtcga
 cgttcaaacggttcgggatgtcattccggtccacgcacaccgagaaat-
 gccagtttctaagttcgtcatttagaaaaaattgtgattttgtataataaaaaagccagccttgcgtggtttatcatttttaaaagttcagctgaatcacaaa
 gttccctgataattacatttagtaacacatagtttcaatgagacatattcaggttaattgg-
 tagcattttcggctggtattataaccctcgcgaatggaacactgcgttcagacacagacgacaccaaactctcaacaatagttcaaaaaaattattgg
 cggcagtggtcaggtgtccgaataacacaaatgagggttaataataatgatgaagcgaatatt-
 ctgtagtagtaatcccgacattgttagtgcgtgagctaatgcagcagaaatctacaacaaagacggcaacaaacttgaccgaattcactcaaa
 tagcaataaaggactctctatgaaatttgaaacttttgccttacac-
 caacctcccaattttctcaacagaggtaatgaacgtttggttaaattaggtcgcattctgaggagtggttttgataccgtatggttactggagca
 tcatttcacggagtttgggttgcgttaacccttatgtcgtcgtcga-
 tatttacttggcgcgactaaaaaattgaatgtaggaactgccgtattgttctccacagcccatccagtacgccaactgaagatgtgaattattgga
 tcaaatgtcaaaaggacgatttccgttgggtatttgcggagggtttacaacaag-
 gacttctgcgtattcggcacagatatgaataacagtcgcgccttagcgggaatgctggtacgggtgataaagaatggcatgacagagggatattgg
 aagctgataatgaacatatcaagttccataaggtaaaagtaaaccccgcgcgta-
 tagcagaggtggcgaccgggtttatgtggtggctgaatcagcttcgacgactgagtggtggtcgtcaatttggcctaccgatgatattaagtggattat
 aaatactaacgaaaagaaagcacaacttgagctttataatgaagtggctcaagaatat-
 gggcacgataattcataatcgaccattgcttatcatatataacatctgtagatcatgactcaattaaagcgaagagatttccggaaatttctggggca
 ttggtatgattcttatgtgaatgctacgactattttgatgattcagacaaacaa-
 gaggttatgattcaataaaaggcagtggtgactttgtattaaaaggacataaagataactatccggtattgattacggttacgaaatcaatcccggt
 gggacgccgaggaatgtattgacataattcaaaaagacattgatgctacaggaa-
 tatcaaatatttgttggatttgaagctaatggaacagtagacgaaattattgcttccatgaagctcttccagctctgatgtcatgccatttctaaagaaaa
 acaacgttcgctattatattagctaaaggagaagaaatgaatttggattgttcttct-
 taacttcatcaattcaacactgttcaagaacaaagtatatgttcgactgcaggaataacggagatgttgataagttgaattttgaacagatttttagtga
 tgaataatcattttcagataatggtgttgcggcgctcctt-
 gactgttctgtgttctgctcgtttaaagagaaaaattaaattggttcattaaatcacatcattacaactcatcatctgtcgcctatagcggaggaagc
 ttgcttattggatcagtttaagtgaagg-
 gagatttattttagggttttagtgattgcgaaaaaaagatgaatgcattttttaaactgcccgggtgaatatcaacagcaactatttgaagagtggtatga
 aatcattaacgatcgtttaaacaacaggctattgtaatccagataacgatttttatagctt-
 ccctaaaatatctgtaaatccccatgcttatacgcaggcgacctcggaatatgtaacagcaaccagtcattcatattgttgagtgggcgccaaaa

aaggattcctctcatctttaaagtgggatgattctaataatgatgttagatatgaatatgct-
gaaagataaaagccgttgcggataaatatgacgttgacctatcagagatagaccatcagttaatgatattagttaactataacgaagatagtaataaa
gctaaacaagagacgcgtgcatttattagtattattgttcttgaaatgcaccctaata-
gaaaatttcgaaaataaacttgaagaataaattgcagaaaacgcgtgtcggaaattatacggagtgtataactcgggctaagttggcaattgaaaagtg
ggtgcgaaaagtgtattgctgtccttgaaccaatgaatgatttgatgagccaaaaaaat-
gtaatacaatattgttgatgataatattagaagtaccacatggaataatacctaataatgatttcgagttgcagcgaggcggaagtgaacgaatccccagg
agcatagataactatgtgactggggtgagtgaaagcagccaacaagcagcagcttgaag-
gatccccgggtaccgagctcgaattcactggcgtcgtttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcggttaccacaacttaatgccttgcagcaca
tcccccttfcgccagctggcgtaatagcgaagggccgcaccgatcgcccttccaa-
cagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatgcggtattttctcttacgcacatctgtgcggtatttcacaccgcataatggtgcactctcagtaca
atctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacaccgccaacaccgcgt-
gacgcgccctgacggcgctgtgtcgtcccggcattccgcttacagacaaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagagggtttaccgcat
caccgaaaacgcgcga

LIITE 4: B4 -plasmidin sekvenssi

[illegible]

gaaccgttgcaaccgcaaagtagatcagcgggtgccgttgcctcttccactt-
catcacgatttcccccataaaaccccgccgaagctgcgccagaatagggaataaagataacgaaggtgtcaccacgccctgaatcagcgtc
atggtgaccatataccattggcgatgtggctgatttcgtgagcaattaccgcctcggtt-
catccgggctcatgttctgcagcaaacgggtgctgacagcaaccagagaggcatcacggcgccaccgggtgcaaaagcgttgatgtccggcgc
atggtagatagccacttgcggcatagcgatccccgcctgacgagcctgggttgcta-
cagtatfgaccagccaacgttcccttctgttacgggttgcctgacacttccccgcaacagatcgtaatgccatccatttggacatcagaagcgaaa
cgaagggaaccacaaaacccaacagcaaggccatgatcatcagccctt-
gaacgctgctcgactgtatccctgtcaggctcagaccagcccgaacgaccattacggccagggttcttagcagggaagcggatccccgggt
accgagctcgaattcactggcgtcgtttacaacgtcgtgactgg-
gaaaaccctggcgttaccacaaacttaacgccttgcagcacatcccccttccgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcccttcc
caacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatgcgg-
tatttctcttacgcatctgtgcgggttattcacaccgcatatgggtgcactctcagtacaatctgctctgatccgcatagttaagccagccccgacacc
gccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttgcctgcttcccgcatccgctta-
cagacaagctgtgaccgttccgggagctgcatgtgacagaggtttaccgctacaccgaaacgcgcga

LIITE 5: B4_5 -plasmidin sekvenssi

gacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgtcatgataataat-
ggtttctagacgtcaggtggcacttttcggggaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttctaatacattcaaatatgtatccgctcatgagaca
ataaccctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagtatgatt-
caacatttccgtgcgccttattccctttttcgggcattttgccttctgttttgcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagt
tgggtgcacgagtggttatacgaactggatcgaacgcggtgaagatcctt-
gagagtttcccccgaagaacgttttcaatgatgagcacttttaagtctgtatgtggcggttattatccgtattgacggcggaagagcaa
ctcggtcgcgcatacactatttctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcaca-
gaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgcataacatgagtgataaactgcggccaacttacttctgacaacgat
cggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgcctt-
gatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccagcgtcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactatt
aactggcgaaacttacttacttgccttccggcaacaataatgactggatggagggcga-
taaagttgcaggaccacttctgcgtcgccttccggctggctgttattgtgataaaacttgagccgggtgagcgtgggtctgcgggtatcattgc
agcactggggccagatggtaagccctcccgatctgtagttatctacacgacggg-
gagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggaactgtcagaccaagtttactcatatat
actttagattgattaaaacttatttttaatttaaaaggatctagtgaa-
gatectttttgataatcctatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatc
cttttttctgcgcgtaactgtgcttgcacaacaaaaaaccaccgctac-
cagcgggtgttgttgcggatcaagagctaccaacttctttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacacaataactgttcttctagtga
gccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgc-
taatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagctgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataagggcgcagcgggtcggg
ctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttggagcgacgacctacacgaactgaga-
tacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttccgaaggagaaagggcggacaggtatccgtaagcggcagggtcgggaacaggaga
gcgcacgaggagcttccagggggaaacgcctggtatcttta-
tagtctgtcgggttccacactctgacttgagcgtcgtattttgtgtagctcgtcagggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcc
ttttacgggtcctggccttttgccttctgtcacatgtt-
ctttctgcgttatccctgattctgttgataaccgtattaccgcctttagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcagcaggt
cagtgagcgaggaagcggaagagcgccaa-
tacgcaaaccgctctcccgcggttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgca
attaatgtgagttagctcactcattaggcaccacagccttactttatgctt-
ccggctcgtatgtgtgtgaattgtgagcgggataacaattcacacaggaacagctatgacctgattacgccaagcttgcattgcctgcaggtcga
ctctagaggatccatccttccatcgatccttggaatgggtatttttaatt-
caacgtaccgttaggtattatgccttgccttgcgtatgcgttttctgccaccaatggttctgcgccagtaaaccccggttgcactgcccgcc
cgtgatgaacgcgttaaccttcggcctgcttactcactgcgtt-
gagtggttctgctcaggggcaatcgtgacgttaattgctcgggaactgggtgtaattggttgggttatttcttattcggccagccttctcttccc
gtaccgctgctaccggttgatttactggtatcccgctgttttacttctatttga-
catctgtttgcttcttctgcacaaatgtggcaatggttccctgccttttactgcaaacgctgctcggcgtagtgaagtcgaaacaggttactt
ctgacaccgtggcgttagcaacgatgggtgatgctccgctggcaggctatttga-
gaacgcgtacatgcaggattgtgggggctttaggtgttcatcatggtgcggggctttttccctggttctgctgcccgcgtcactgcggatgc
aatattatctggcgatgatcttatgtggtgctgatttggcttattccagtcacccaa-
taaccacaccattattacctccgcgcctcgcgaacgtagcgggtggagccagtggtgcatgtaggaacggctcgtctactgggtcagagtagcggcgc
ggcgtggtggcgctgatgtaaatcagtttgagataatgttacacacgtctcgtgat-
ggctcggctatttctggcagtgattgctgcctgtgtcagtggttactgatacactcagccacgatccagggcataaaaaagcgctcgtatcaggac
gcgcttttagtatttactcaattccttattaccccttatt-
cctggatttttccgaaatctgggagcgtataaacatctggactcgtataaatcagttgactggttctatgccttcttccacatattatgtatatca

actaataccgtattattatcataacatatagacatagttccattgtatttttagcgctt-
 ctcaaatctcttttggatggatagatccatctcgtacttttctgtaaacgatttgcttactggcttcacaagtctgccaatattaatcttaattctttaa
 atttccattttaaaaaaatgccattgctt-
 cagcgtttttgtagcaaacgaaaagtcagaacatgaataaagtatacttcttctatcgagaatctccctcaaattttcaaaatcacataacctcttoga
 aagaactcttcttctgcatgccaactttgcatctttatacccatcaactgccattgcac-
 caagctaatacttcccaatgcaagcataactgccaatttttcatgttatctcttttcttggagccaataataacaatgagaacaatgttaagccaacc
 ccataaacctctatcaagtaaccaaatgtggatgttttgagaaatttgaagtgtat-
 gtcattcagatttataacgcaagcattccacttacaattaggcaagatatcaactatcaaacgcttcggtaagcttaagcacaccctttctgcgt
 cctcgtattgacgcgacgtaaaattcaacgagcacgcccgggatacttaccatattctctgc-
 taattatcccgcacatcatcggtacaataaatgctggataactgttgctgacgcacatccataactcatcaacccggcggtccatcagggtacaggtt
 caacgtttcaggatcaagcgctcgcatataccacggcggaacat-
 gtttaccgtgcatcttccctcaagaaacaagtgttgagttcaactgtatataatctcggatctgactaatatcactgagattgaaagtatacaataa
 aagatgattgaaatcatcacgtttcagagatt-
 cttttctgtaactttccagccgctcgggttatgataaaaggcttttatctccagaaaatgagattttttatcttcatataatggcagagtaataataa
 agtatggcgaaccaataagacaaagatcttccctgattttttatcttcaagactatt-
 caatgttttaacaaaatctattcttctgttacggtaaatgtcgtaggatatacaatccaccaaactcataacatatttaaccaaataattatgagcat
 taaatctatctggtcccaaatgactaattctattgatgatcaaaccaactaccaaca-
 tattcatgccataactcacagcctaagagtctcctaacttaattgtcagcgccacctgacttttaaacattcgtgccgctactggtaaacca
 actttcaatctcgttttctgagaagttaataagcgagtaaaacttaaaaccgatgttgg-
 gaatacaggatgtatcaatttccgtaattgtcatctactttgtgctgacagtagtgacgatattctcgacaatgtttataatgattacgaaatgcat
 caagcacaagtttcttctgatttttctgctcgtcgtgaagaccacactaat-
 ggatcgtcgaaaaaatcaaatcatcaatttctgagctgtcgtgaatttctgtttatcaacatatgaagtcatactgttttactcctcaagataatattaga
 aagtatggcagcactgctgtcactcttttataccctt-
 catctttcaagctgctgtttgttggctgttccactcaccgcacatagttatctatgctcctggggattcgttcaatttaagacagagaaattgcttg
 attttcaatcgaattctcattcggcgttcattgactgtcgaatagttaattgttcaat-
 gacggttcagtaataatcaatcaatccagatgatcattatccatcgcatagcggtttcgtaacggattgataaaaattgcgcaggaccactaaat
 ttctactcaagtcagcgaacttctaacaagaatatacttgcacgattactacgaa-
 tatttgataacaatgtgataactcatcttctgttgcaccaattatcgtatttgcagtaaaagcaataaacggatatcaagatacatctgttataattgtag
 aagctaaattcttccaacaaaatcaagacaattctcgaagactt-
 cagcacccaatttatggccttcaaaatctagattatccggcaattcattaatgggtagactgagataatcaaacctaaagcttttcaagagaatatctt
 aagttacaacaccgactgcggtgattaaaaacgaagcattgattcagataggcttgca-
 taagctatccgcgcagataagcttgaagccaacataccgaagtatttttctgtagttaaccaatcaaccactgctaacaagctctgctttctata
 gacattgtaattcatcaattgtccctgaactcaatccaacgtggtgaagcgaatca-
 tagcggatcacatgaatccattccgcgataaatattccgcagaccagcaaatgatccatctcggggcaaaaccagacgcaataaatggcat
 tcttctcttgggctgttttcttggcagcgtttcccaacat-
 gaattttttatttcttcaacacaaataacgtggtcgtggttttatatttatttatttccatacttttaccattatgggacaaatacaaggaaacttatctt
 ttccaggaatcgagctgttctatttcaaccgcaacatccttagccgtatagttagat-
 ggctttcatgagaatatatgactaatcgttgaacggtctcattccgtcatgagatccaccaactcgaaatattgttattcattcctgcttctacaatcc
 ttccgcaccttttaattgtaacgcatctcgatatttaattgatgactcccaaggaaaaata-
 gatattggttgcgtctattttttgaacataaggcaatatttgcataattatcgacgtgatgaaggtaacacacatctgccaagtgttgattaaattcca
 cactgcatgttgaactaataatcatccaacgttgatgaatatccaccttacttttaatt-
 ccagcaaacagcttttcttttgaactaaagaataggccgcttttcatcaaaatctttttggcattcggtaatatatgcgcatatagattattttctatc
 aacgtaacttaattcctcataatgatttccatgtaatat-
 gttttgggcagaaaaaagctcgtgctgataaaaaaacaatcatgagccgcacctgtcgtcggagctcaaatcaacaggattatcgataatg
 caaagactcttttgaaccaaatttaacatcagcataagatggcgcatgctc-
 taccgccaattatcgcatctggccctcccaagcgacaataacatccgatgtcgcataattcttttgcgagtgatgtatcaccttgggtggggcca
 atataacagataaagagcgcttctcggatgattgggtctacatcaataaaact-
 taacgctaattgcatagcggtaaaaggatcgggtgacgatgttttataatacactgattcttagttaaattgcgcgtaatatagacatgatccagataa
 tgggaacattacctgccaacagatgtacagatttaccttgcgaaaagccccgaaca-
 taactttcatcctgaggtagccattcatcatgatggcgagaaccaagttcatttttacaacatcataaaggccgctttgaacataaaatcataga
 tatcaattggcctctagcttagccatttctctgaatatccata-
 tattttttaagtcacgaatgtatgtcctgcttctgagttatttcttattttccatttggcctaccgtatagagaaaattgacaatgttatgcaaccgtaatt
 cgttatttccattacaataatgtttttacatgagagtcattcaatttggcagg-
 taaactattatcacaaaattatggattgcactaaatcatcatttccgggaagatttcaacctggcgttaataatgaatgaaatttttttagtcatatt
 tgccatccatttaattggggtaatttcaacttaagttgctgtt-
 taactatcttgcgaactggtcgtaccaacactgttcttatttttgtgtatgacgatgtaataacaaatatatagaaaatcagattctgactacgtggt
 tcttgcctgttaacttctgcataattatgataataa-
 taaatttctgctcaaggttttaattcaactgaatggatcgtcaataaacgcctattccggttttaattatctgtttaaataagcaaaaggaaaatttcatatca
 acaagatttgttaattgaaaagtttaattaaaaaagtcattcttctctaatgcgtgataa-
 tatttatgtaattattatcctgagattatttcaacaataccgatagaaatagattgaatagcaatctaattttaccggcagatttctaagaagaattgcat
 attacttcaggatttaccggtagcgagacttcaatt-
 cgttatccagcggcggtgggtcatgaacaactcactgagcgatttgcacttaccgtaattgcagagagccatcatgctggttcttctgcggttcat

agctggttttcaggcgctgcagcgcggaatcattttctgcgcac-
 caaccagtttgcgaaccggcatcagcatggaattcacgatgacgcgagaaccacatggtgataatgctcgccagaataaccaaacaccagttcca
 gaaccgttgaaccgcaaagtagatcagcggttgccgttctcttccactt-
 catcacgatttccgcccataaaaccgcggaagctgcgccagaatacgggaaataagataacgaaggtgtcaccacgcctgaatcagcgtc
 atggtgaccatataccattggcgatgtggctgatttctgtgagcaattaccgcctcggtt-
 catccgggctcatgttctgcagcaaccgggtgctgacagcaaccagagagggcatcacggcgcgaccgggtgcaaaagcggtgatgtccggcg
 atggtagatagccacttgcggcatagcgatccccgcctgacgagcctgggttgcta-
 cagtattgaccagccaacgttcccttctgtacgggtgtctgatcacttccccgcaacagatcgtaatgccatccatttggacatcagaagcgaaa
 cgaaggaaccacaaaaccgaacagcaaggccatgatcatcagccctt-
 gaacgctgctcgaactgtatccctgtcaggtcagtagcagccgaaaacgaccattacggccagggttcgttagcaggaagagcggtatccccgggt
 accgagctcgaattcactggcgtcgttttacaacgtcgtgactgg-
 gaaaaccctggcggttaccacaaactaatcgccttgacacatcccccttccgcagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgccttcc
 caacagttgctgcagcgtgaatggcggaatggcgccgtgatcggg-
 tatttttcttaccgcatctgtgcgggtatttccacccgcatatggtgacactctcagtagcaatctgctctgatgccgatagtttagccagccccgacaccc
 gccaacaccgctgacgcgacctgacgggctgtctgctcccgcatccgctta-
 cagacaagctgtgaccgtctcgggagctgcatgtgtcagagggtttaccgctcatcaccgaaacgcgcga

LIITE 6: B4_5_9 -plasmidin sekvenssi

cgccgaataaacctgtgacggaagatcacttgcagaataaataat-
 cctggtgtccctgttgataccgggaagccctgggccaacttttggcgaaaatgagacgttgatcgccacgtaagagggtccaactttcaccataatgaataa
 gatcactaccggcgctatttttgagttatcgagatttccaggagctaaaggaagctaaaaat-
 ggagaaaaaacactggaataaccacgttgatatacccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccaga
 ccgttcagctggaattacggccttttaagaccgtaaagaaaaataagca-
 caagttttatccggcctttatcacatttgcggcctgatgaatgctatccggaaatttctgatggcaatgaaagacggtagctggtgatatgggatagtgtt
 caccctgttacaccgttttccatgagcaaaactgaaacgttttcatcgtctgagtgaa-
 taccacgacgatttccggcagtttctacacatatactcgaagatgtggcggtgttacgggtgaaaaacctggcctatttccctaaagggtttattgagaatatgtttt
 cgtctacggcctccctgggtgagtttccaccagttttgatttaaacgtggcgaatat-
 ggcaaaccttcttgcggccgttttaccatgggcaaatattatcgcgaagcgacaaaggtgctgatccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatg
 gcttccatgtcggcagaatgcttaataaataaacagtagtactgcat-
 gagggtggcgggcggtgaatttttaaggcagttattggtgcttagaataattttatctgattaataagatgatcttcttgagatcgttttggctgcgacgata
 tcagatctgatccggccagatgcgtccggcgtagaggatctgaagatcagcagtt-
 caacctgttgatagtagtactaagctctcatgtttcacgtactaagctctcatgtttaacgtactaagctctcatgtttaacgaactaaacctcatggttaacgt
 actaagctctcatggttaacgtactaagctctcatgtttcacgtactaagctctcat-
 gtttgaacaataaataataataatcagcaacttaaatagcctctaaggttttaagttttataagaaaaaagaataataaagcgttttaagcgttttaaggtttta
 cgggtgtggacaacaagccagggtgaacgcactgagaagccctta-
 gagcctctcaaaagcaattttgagtgacacaggaacacttaacggctgacatgggaattgcgcgaattaacctcactaaagggaacaaaagctggagctc
 caccgcggtggcgccgctctagaactagtgatccatcctctccatcgcacccgtgaaat-
 ggtatttttaataacgtaccgttaggtattatcgccctgcttctggcgatcggttttgcacccaatggttctcgcgcagtaaaccccggttcgacctgccc
 agcgccgtgatgaacgcgttaaccttgcgcctgcttactactgcgtt-
 gagggttctgcaggggcaatcgtgacgttaattgctgcggaactggtgtaattggtgtgtgtgtgttttttatttgcggccagcttttcttcccgtacc
 gctgctaccgggtgatttactgctatcccgctgttttacttctatttga-
 catctgttgccttcttgcgcacaaatgctgcaatggtttccctgccccttttacctgcaaacctgctcggcgtagtgaaagcgaacaggttacttctgac
 accgtggcggttagcaacgatggtgatggtccgctggcaggttattgattgaacgcgta-
 catgcaggttgcgtggggtttaggtgttcatcatggctgcggggttttccctggttctgctgcccgcgtcacctgcggatatcaattattctggccg
 atgatcttatgtgtgctggttatttccagtcaccaataaccacaccattat-
 tactccgcgcctcgcgaacgtagcgggtggagccagtggaatgtaggaacggctcgtctactgggtcagagtagcggcgcggtggtggcgctgat
 gctaaatcagtttgagataatggtacacacgtctcgtgatggctgcggctatt-
 ctggcagtgattgctgctgtgctggtttacgtactcagccacgatccagggcataaaaaaagcgcgtcgcagcagcgcgttttttagtatttacttc
 aattcctttaatcccttaattcctgatttttctcgaatctgggagcgta-
 taacatctgactcgtataaatcagttgactggtttctatgccttcttgcacatattatgtatatacaactaataaccgtattattatcataacctatagacatagtt
 ccattgtattttagcgcgttctcaatttcttcttggatgatacgtat-
 gatccatctccgtacttttctgtaacgatttcttactggttcacaaagctgcgaatattaatctctaatttttaaatctccatttaaaaaaatgccattgctca
 cgtttttgttagcaaacgaaaagtcagaacatgaataaagtatacttcttatt-
 cgagaatctccctcaaattttcaaatcacataacctcttgcgaagaaactcttctgtcatccaaactttgcatctttatacccatcaactgccattgcacca
 aagctaatactcccaatgcaagcataactgcaatttttcat-
 gttatctcttttctgttagccaataataacatgagaacaatgttaagcaacccataaacctctatcaagtacccaatgtggatgttttgagaattttgta
 aagtgtatagtcattcagatttataacgcaagcattccacttacaattaggcaagga-
 tatcaactatcaaacgcttcgggttaagctaaagcacaccttctgctcctcgtattgacgcgacgtaaaatttaacgagcacgccgggatacttaccatat
 tctctgtaattatcccgcacatcaggttaacaataatgctgataactggttgc-
 gacgatccatataactcatcaaccccggttccatcagggttcaacgtttcaggatcaagcgtcgcgcataaccacggcggaacatgtttac

gctgcatttcctcaagaacaagtggtgagttcaacttgattaaata-
 tatctcggtatctgactaatatcactgagattgaaagtataaaatgattgaaatcatcacgttcagagattcttttcgtaactttccagccgctccgg
 ttatgataaaagcgttttatctccagaaatgagattttttatctttcatataat-
 ggcagagtaataaaataaagtatggcgaaccaataagacaagatctttcccttgattttttatctggtcaagactattcaatgttttaacaaaatctattcgttctt
 tgttacggtaaatgtcgtaggatataacaattccacaaactcataacatatt-
 taacaaaatattatgagcattaaatctatctggtccaaattgactaatctatttgatgatcaaaccaactaccaacatattcatgccataactcacagagcct
 aagagctctcaatacttaactctggtcagcgccacgtgacttttaaacattcgtccgc-
 tactggtaaaccaacttcaatctcgtttctgagaagttaataagcgagtaaaacttaaaaaccgatgttggaatacaggtatgtcatcaattccgtaaatg
 tcatctactttgtgtcctgacagtagtgacgatattctcgacaatgtttataatgat-
 tacgaaatgcatcaagcacaagtttcttctgatttttctgctgctgtaagaccacactaatggatcgctcgaaaaatcaaatcatcaatttctgagcttgc
 gtaatttctgtttatcaacataggaagtcatactggtttactcctcaagataatatta-
 gaaagtatggcagcactgctgtcatactctttatacccttcatcttcaagctgctgctgttggctgcttctactcaccagtcacatagttatctatgctcctg
 gggattcgttcaacttaagacagagaaattgcttgattttcaatctcaattctcatt-
 cggcgttcattgactgtcgcaatgtaaatgttcaaatgacggttcagtaatatcaacatcaatatccagatgatcattatccatcgcgatagcggctttcgtaa
 ccgattgataaaaattgcccagaccactaaatttctactcaagtcagcgaacttcc-
 taacaaagaatatcttgcacgattactacgaatattgatacaatgtgataacttcatcttgccttgaccaattatcgttattgtagtaaaagcaataaacgg
 tatatcaagatacatcatgttatttaattgtagaagcctaaatcttcccaacaaaaatcaa-
 gacaatctctcgaaagactcagcaccctaatgtgcttcaaaatctagattatccggcaattcattaatgggtagactgagataatcaaacctaaagctc
 ttcaagagaatatcttaagttaacaacaccgactgctggtgattaaaaacgaagcatt-
 gatttcagataggcttgataagctatccgcgagataagcttgagcccaacataccgaagtatttttctggtgtagttaaccaatcaaccactgctaacaag
 ctctgcttctatagacattgtaaattcatcaattgtccctgaactcaatccaacgtggt-
 gaagcgaatcatagcggatcacatgaatccattccgagataaatattccgagaccagcaaatgatccatctcggggcaaacagacgcaataata
 atggcattcttcttctgggctgttttcttctggcagcgtttcccaaacat-
 gaattttttatttcttcaacacaaacagctggtcgatggtttatatttgattcattttccatactttacattatgggacaaatacaaggaacttatcttctcca
 ggaatcgagctgttctatttcaaccgcaacatccttagcgtatagttagat-
 ggctttcatgagaaatatatgtcactaatcgttgcaacggtctcattccgctatgatccaccaactcgaaatatgttattcattcctgcttctacaatcctttcc
 gcacttttaattgtaacgcatctcgatatttaaatgatgactcccaaggaaaaatagatat-
 gggttgcgtctatttttgaacataaggcaatattgtcctaattatctgacgtgatgaaggtacacacatctgccaagtgttgattaaattccacacctgcatt
 gactcaataatcatcaacggtgatgaatccacctctacttttaat-
 ccagcaaacagcttcttttgaactaaagaataggccgctttcatcaaaatcttttggcattcggtaatatatgcgcatatagattaaattttctatcaacg
 ctacttaattctcataatgatttccatgtaatatat-
 gttttggcgagaaaaacaagctcgtgatcgtataaaacaaacatcatgagccgcacgtgctgctggagctcaaatcaacaggattatcgataatgcaaa
 gactcttttgaacaaaatttaacacatcagcataagatggcgatgctc-
 taccgccaattaatcgcacttgccctcccaagcgacaataacatccgcatgctgcataatttcttttgcgagtgatgtatcaccttggtggggccaatatat
 aacagataaagagcgcgttatcgatgattagggtctacatcaataaaacttaacgcta-
 gcattagcggtaaaaggatcggtgacgatgttttataatacactgattcttagttaaattgcgcgtaatatagacatgatccagataatggaacattacctg
 ccaacagatgtacagatttaccttgcgaaaagcccgaacataacttcatctgagg-
 tagccattcatcatgatattggcgagaaccaagttcattttctacaacatcataaaggccgctttagaacataaaatcatagatatccaattggcctctagctta
 gccatttcttctgaatatccatataatttttaagtcacgaatgtatgctcgtgctt-
 gagtattcttcaattttccatttgcctaccgtatagagaaaattgacaatgttatgcaaccgtaattcgttatttccattacaatcaataatgtttttacatgagag
 tcattcaatattggcaggtaaacactattatcaccaaaatgaatgattgcaactaaat-
 catcatttccgggaaagatttcaacctggccgttaaatgaatgaaattttttagtcataatttgccatccatttaattgggggtaatttcaacttaagtgctgtttaa
 ctatcttgcgaactggtcgtaccaacactgcttctatattttgtgttatgacgat-
 gtaataaacaatatatagaaaatcagattctgactacgtggttctgacctgtaacttctgcataattatgataataataaaatttctgctcaagggttttaact
 aactgaatggatgtaataaacgcctattccggtttaaatactgttaaaatagcaaa-
 gaaaatttcatatcaacaagattgttaataaaaagtttaataaaaagtcagctcttctctaatgcgtgataatatattatgtaaatattatcctgagtattttc
 acaataaccgatagaaatagattgaatgcaatctaattttaccggcagatttctaagaa-
 gaattgcataattactcaggtattcaccgtacgcagagcttcaattcttatcagcgcggtgggtggtcatgaacaactcactgagcgatttgcacttaccgt
 taatgcagagagccatcatgctggtgcttcttgcggttca-
 tagctgggtttcaggcgctgcagcgcggaatcattttctcgcgaccaaccagttttgccgaaccggcatcagcatggaattcacgatgacgcgagaaccac
 atggtgataatgctcgcagaaataacaaacaccagttccagaaccgttgcaaccgcaaaagta-
 gatcagcgggttgccgttgccttctacattcattcagatttccgccataaaaaccggcgcaagctgcgcagaaataggggaaataaagataacgaaggt
 gttcaccacgcccgaatcagcgtcatggtgaccataaccattggcgatggtgct-
 gatttctgtagcaattaccgctcgttctacccgggtcatgttctgcagcaaacgggtgctgacagcaaccagagaggcatcagcgcgaccggttg
 caaaagcgttgatgtccggcgatgtagatgccacttgcggcatagcgtccccgct-
 gacgagcctgggttgcacagtattgaccagccaacgttcccttctgtaacgggtgctgcatcacttccccgcaacagatcgtaatgccatccatttggac
 atcagaagcgaacgaaggaaccacaaaccgaacagcaaggccatgatcatcagccct-
 gaacgctgctgactgtatccctgtcaggctcagttaccagcccgaacgacattaccggcaggttcgttagcagggaagagcggatccccgggctgca
 ggaattcgatatcaagcttatcgataccgtcagcggcgccagcctcgagagcaggatt-
 cccgttgagcaccgcccaggtgcgaataagggaacagtgaaagaaggaacaccgctcgcgggtgggcttctacatttccctatctgcccgggtgacgcccgttg
 gataccaaggaagcttacacgaaccttggcgaatctgtatatctgctgcaaaaag-
 gatggatataccgaaaaatcgctataatgaccccgaaagcagggttatgcagcggaagagcgtgttaccatcgcctatagtgagtcgtattacgcg
 cgcgatatcaattg

LIITE 7: Valon tuoton testaus luminesenssi ja absorbanssi

Luminescence (counts) pMMT1+pB4_5_9_a5

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	160	207	247	189	0	0	0	0
B	13987	14327	14626	14543	297	256	191	169
C	327	513	602	677	557	446	406	258
D	454	648	887	1435	3580	4036	3838	3146
E	953	1139	1570	3932	1102428	1115913	1112779	1097417

Absorbance, blank-corrected OD (450) pMMT1+pB4_5_9_a5

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,599	0,59	0,61	0,608	0	0	0	0
B	0,188	0,192	0,197	0,196	0,438	0,433	0,433	0,432
C	0,532	0,552	0,553	0,552	0,488	0,484	0,483	0,485
D	0,561	0,568	0,585	0,586	0,308	0,312	0,308	0,304
E	0,569	0,575	0,585	0,584	0,345	0,342	0,344	0,341

Pipetointikaavio, jokaisella rivillä 4 rinnakkaista näytettä vasemmalta oikealle.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Näyte I				LB-liemi			
B	Näyte II				#1255 neg			
C	Näyte III				#6152 neg			
D	Näyte IV				#6141 matala pos			
E	Näyte IV				#5455 korkea pos			

LIITE 8: Valon tuoton stand. luminesenssi ja absorbanssi

Luminescence (counts) pMMT1+Sy327/pEfB6 pSW23T (Näyte 4 ja 8). pMMT1+pEfB7-a pKNG101 (Näytteet 9, 10, 15 ja 16)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	8450	8527	8354	8219	0	0	0	0
B	7934	8285	8263	7831	357	272	286	235
C	1913	2147	2353	2348	730	729	600	432
D	13942	14290	14434	13925	1001	891	762	572
E	2096	2737	3183	4267	6579	7874	8451	7102
F	12044	12579	13314	17577	1996126	1991047	2018204	2007965

Absorbance, blank-corrected (OD 600) pMMT1+Sy327/pEfB6 pSW23T (Näyte 4 ja 8), pMMT1+pEfB7-a pKNG101 (Näytteet 9, 10, 15 ja 16)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,34	0,345	0,352	0,35	0	0	0	0
B	0,373	0,375	0,378	0,361	0,381	0,381	0,38	0,392
C	0,382	0,391	0,391	0,386	0,42	0,417	0,42	0,426
D	0,4	0,412	0,41	0,405	0,314	0,319	0,317	0,315
E	0,403	0,414	0,422	0,411	0,215	0,233	0,239	0,241
F	0,438	0,442	0,448	0,443	0,337	0,331	0,328	0,332

Pipetointikaavio, jokaisella rivillä 4 rinnakkaista näytettä vasemmalta oikealle.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Näyte 4				LB-liemi			
B	Näyte 8				#1434 neg			
C	Näyte 9				#5958 neg			
D	Näyte 10				#5963 neg			
E	Näyte 15				#6141 matala pos			
F	Näyte 16				#5455 korkea pos			